

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Estudios entomológicos en el foco de leishmaniosis del
suroeste de la Comunidad de Madrid**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Estela González Fernández

Directores

María Isabel Jiménez Alonso
Ricardo Molina Moreno

Madrid
Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Estudios entomológicos en el foco de leishmaniosis del
suroeste de la Comunidad de Madrid

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Estela González Fernández

Directores

**María Isabel Jiménez Alonso
Ricardo Molina Moreno**

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología

TESIS DOCTORAL

**Estudios entomológicos en el foco de
leishmaniosis del suroeste de la Comunidad de
Madrid**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Estela González Fernández

Directores

**María Isabel Jiménez Alonso
Ricardo Molina Moreno**

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIOS ENTOMOLÓGICOS EN
EL FOCO DE LEISHMANIOSIS DEL
SUROESTE DE LA COMUNIDAD
DE MADRID**

ESTELA GONZÁLEZ FERNÁNDEZ

MADRID, 2018

DÑA. MARÍA ISABEL JIMÉNEZ ALONSO, Doctora en Farmacia, científica titular de OPIs en el Laboratorio de Entomología Médica, Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III y Profesora Asociada del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y D. RICARDO MOLINA MORENO, Doctor en Biología y científico titular de OPIs en el Laboratorio de Entomología Médica, Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “ESTUDIOS ENTOMOLÓGICOS EN EL FOCO DE LEISHMANIOSIS DEL SUROESTE DE LA COMUNIDAD DE MADRID” presentado por la licenciada en Biología, Dña. Estela González Fernández, ha sido realizado en el Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Madrid, de de 2018

VºBº Directores

Dra. María Isabel Jiménez Alonso

Dr. Ricardo Molina Moreno

La interesada

Dña. Estela González Fernández

La realización de la presente Tesis doctoral ha sido posible gracias al apoyo y financiación de las siguientes entidades:

- Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid.
- Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid.
- Colegio de Biólogos de Madrid

Y del proyecto:

- AGL2008-01592/GAN: Biology and control of vector-borne infections in Europe (EDENext Collaborative Project): Sandfly-borne diseases subproject (PBD) (UE, FP7-HEALTH-2010-single-stage, contract N° 261504).
 - Entidad financiadora: UE-FP7
 - Duración: 2011-2014
 - Investigador Principal: Dr. Ricardo Molina
 - Coordinador General: Dr. Petr Volf

**A la persona que más admiro,
mi ejemplo a seguir...**

Mi madre.

Agradecimientos

¡Y por fin se hizo la luz! Ha sido un camino tortuoso, difícil, con muchas cuestas arriba y piedras en el camino, pero a su vez ha sido un camino apasionante, una etapa de formación y aprendizaje continuo que me ha permitido crecer profesionalmente, pero mucho más a nivel personal. Se termina una etapa, y esta no habría empezado sino fuera por la confianza depositada en mí por los directores de esta tesis: Ricardo y Maribel. Gracias a los dos por estar ahí en todo momento, por ponerme las pilas cuando era necesario, por todo lo que me habéis enseñado, por contagiarme la pasión por la investigación, por vuestro tesón y ganas de seguir a pesar de todos los obstáculos. Gracias de verdad a los dos por vuestra dedicación. No hay palabras suficientes para expresar lo agradecida que estoy de haber llegado a este laboratorio y haber trabajado a vuestro lado, aprendiendo y creciendo día a día. Gracias de todo corazón.

Como no, gracias a las que durante estos años fueron mis compañeras de laboratorio: Inés, quien siempre tuvo un hueco para explicarme cualquier duda; Sonia Hernández, quien ha sido un enorme apoyo durante estos años, siempre animando y echando un cable (¡cuántas preparaciones de flebotomos habremos montado entre las dos!); Sonia Ruiz, o “Sonia pequeña”, siempre con su entusiasmo, ganas de aprender y dando ánimos. Y el resto de estudiantes que han realizado sus TFG, TFM, prácticas extracurriculares, o estancias, como es el caso de Latifa, quien durante sus diferentes visitas siempre me ha animado.

También quiero agradecer al personal del Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología cada muestra de apoyo y vuestra colaboración cuando ha hecho falta.

No me puedo olvidar de los grupos de Arbovirus y de Papilomavirus, quienes prestaron su espacio cuando fue necesario para poder continuar trabajando a pesar de todos los inconvenientes surgidos. Gracias.

Pasando a un terreno más personal, me voy a remontar unos cuantos años, bastantes, y agradecer, con todo mi corazón, a todos aquellos profesores que tanto me marcaron, esos “profes” que confiaron y siguen confiando, en que podría alcanzar mis metas y me encaminaron hacia ellas. Porque fue entre los muros de mi colegio donde me dijeron una frase que jamás olvidaré, que cuando he tenido dudas o bajones me ha hecho levantar la cabeza: “Sexa o que sexa que queiras facer na túa vida, eres quen de conseguilo”. Muchas veces no se os da el crédito que merecéis, pero para mí habéis sido un pilar fundamental. Don Miguel, Don Diego, Marcial, José María, Maricarmen, Amparo, Rosa, Isabel, Mayte, Maribel, Don Juan... ¡Gracias!

Gracias a todos los que aunque estando lejos siempre habéis tenido una palabra de apoyo, todas esas personas que cuando dije que me venía para Madrid me habéis animado y os habéis preocupado por mí, toda esa *xentiña* que tanto *boto de menos*.

Pao, qué te voy a decir a ti, si eres mi heroína. Carol, ese apoyo constante en la distancia, ¡cómo te echo de menos! Ángela y Javi; Antonio y Rebe, los años pasan y siempre, incondicionalmente, estáis ahí, haciendo un huequito para vernos y ponernos al día en mis cortas visitas a Vigo; Yumi y tus abrazos curativos; mi pequeña Marta... Todos sois buena parte de que sienta tanta morriña. Pero en Madrid también me he encontrado con buena gente. Bruno, tú fuiste el primero que nos recibió aquí, siempre dispuesto a echar una mano, soportándome, gracias por ser cómo eres. Isa, mi ibicenco-alemana favorita, espero que nunca pierdas ese espíritu de bióloga. Chelo y Asier, Madrid sin vosotros no es Madrid, habéis hecho que esta ciudad sea mucho más acogedora, gracias por ser como sois, por vuestro cariño y amistad. Aarón, te tengo que incluir en el grupo de madrileños, y aunque has llegado ya en la última etapa, no por ello me olvido de ti y todos los ánimos que me das siempre. Y Virginia, casualidades o causalidades de la vida, nos cruzamos y aquí estamos, mil gracias por todo, tu amistad, tu infinito apoyo, por escucharme, por compartir tanto y, ¡lo que nos queda!

Gracias a mi familia. A mi abuelo por sus charlas y consejos. A mi abuela Otilia, mujer luchadora que me enseñó tanto a pesar de nuestras diferencias, ojalá pudiera estar aquí... Gracias a mi hermano Kike, a Ara y, como no, a mis sobrinas, a las cuales adoro y tanto echo de menos. Lo más duro de estos años, junto con el estrés y agobio de las circunstancias, ha sido teneros lejos y no poder veros tanto como me gustaría. Espero poder recompensar mi ausencia y enseñaros a luchar por aquello que queráis ser, por aquello que os apasione, igual que vosotras me enseñáis a no dejar de ser niña, a no olvidarme de la inocencia e intentar ser la mejor tía posible. Os quiero hasta el infinito y más allá, mis pitufillas.

Evidentemente, gracias a mis padres por todo. Desde pequeña me inculcasteis que lo que uno quiere algo le cuesta, que el esfuerzo es la clave y al final uno obtiene la recompensa. Gracias mamá por ser el mejor ejemplo de superación y fuerza, por siempre estar a mi lado aunque hubiera unos cientos de kilómetros entre nosotras. Siento todos los momentos de preocupación, espero compensarlos.

Y aunque le deje para el final, él sabe lo importante que es para mí. Se vino a Madrid conmigo y me ha aguantado todo este tiempo, todos los malos momentos, todos los bajones, pero también ha habido muchas alegrías. Me ha tenido que soportar hablándole de flebotomos, de leishmanias, leerse esta tesis... Paciencia infinita la suya. Gracias por tanto, por nunca perder tu peculiar sentido del humor y hacer que todos los días, incluso en los peores, hubiera una sonrisa. Gracias, Ness, te quiero.

...As cousas nunca se cambian de golpe

Pero non podes cansarte

Non quedas durmido

Porque o desta viaxe

Non é un camiño

Son mil, i hemos de andalos todos

E imos avanzando

Sen un soio silencio

Que o vento segue soprando

I este é o noso tempo...

Versos de luz (Raquel González Gamallo)

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Leishmaniosis	7
1.1.1. Aspectos generales.....	7
1.1.2. Posición taxonómica de <i>Leishmania</i>	12
1.1.3. Métodos de caracterización	14
1.1.4. Cambios globales. Emergencia y/o reemergencia de enfermedades transmitidas por vectores	17
1.1.4.1. Cambios globales y leishmaniosis	20
1.2. Los flebotomos.....	21
1.2.1. Identificación	22
1.2.2. Taxonomía	24
1.2.3. Métodos de muestreo de flebotomos	26
1.2.4. Control del vector	29
1.2.5. Biología del flebotomo.....	31
1.2.5.1. Ciclo de vida	31
1.2.5.2. Apareamiento y oviposición	32
1.2.5.3. Sitios de reposo.....	33
1.2.5.4. Rango de vuelo	33
1.2.6. Alimentación	33
1.2.7. El parásito en el vector.....	35
1.2.7.1. Metaciclogénesis y transmisión del parásito	36
1.2.7.2. Incriminación de los flebotomos como vectores.....	39
1.2.7.3. Competencia vectorial	40
1.3. Detección de <i>Leishmania</i> spp. y otros tripanosomátidos en flebotomos.....	41
1.3.1. Visualización de promastigotes mediante disección del tubo digestivo	42
1.3.2. Detección e identificación mediante métodos moleculares.....	43
1.4. Determinación del origen de la sangre ingerida por hembras de flebotomo	46

1.5.	Situación de la leishmaniosis en España	50
1.5.1.	Reservorios de la leishmaniosis en España	52
1.5.2.	Flebotomos presentes en España. Distribución.	54
1.5.3.	Situación de la leishmaniosis en la Comunidad de Madrid. Brote de leishmaniosis humana en la región suroeste de la Comunidad	58
1.5.3.1.	Distribución temporal de los casos	60
1.5.3.2.	Distribución espacial de los casos	61
1.5.3.3.	Demografía y características socioeconómicas de la zona	62
1.5.3.4.	Descripción del área y cambios sufridos por el entorno	63
1.5.3.5.	Presencia de potenciales reservorios domésticos y silvestres	64
1.5.3.6.	Medidas de actuación.....	65
2.	OBJETIVOS	71
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	75
3.1.	Descripción del área del estudio entomológico	75
3.2.	Estudio entomológico	76
3.2.1.	Estaciones de muestreo.....	76
3.2.2.	Métodos de muestreo	79
3.2.2.1.	Trampas adhesivas	79
3.2.2.2.	Trampas de luz tipo CDC	84
3.3.	Disección de las hembras de flebotomo capturadas vivas	87
3.4.	Aislamiento de promastigotes a partir del tubo digestivo infectado de un flebotomo	88
3.4.1.	Crioconservación de promastigotes en N ₂ líquido	89
3.5.	Caracterización de los aislados.....	90
3.5.1.	Extracción de ADN a partir de cultivos de <i>Leishmania</i>	90
3.5.2.	Cuantificación de ADN	90
3.5.3.	Amplificación mediante PCR de las regiones ITS1 e ITS2	90
3.5.4.	Electroforesis de ácidos nucleicos	91
3.5.5.	Purificación de las bandas	91
3.5.6.	Secuenciación y análisis bioinformático de las secuencias	92

3.6.	Estudio de las tasas de infección de flebotomos mediante detección molecular	92
3.6.1.	Extracción de ácidos nucleicos a partir de flebotomos	92
3.6.2.	Protocolos de amplificación de ADN para detección de <i>Leishmania</i> spp. y otros tripanosomátidos	94
3.6.2.1.	PCR ADNk	94
3.6.2.2.	PCR <i>cpb</i>	95
3.6.2.3.	PCR ITS1	95
3.6.2.4.	PCR ARNr SSU.....	95
3.6.2.5.	Electroforesis de ácidos nucleicos	96
3.6.2.6.	Análisis filogenético	96
3.6.3.	Detección y estimación de la carga parasitaria en flebotomos infectados por <i>L. infantum</i>	98
3.6.3.1.	Optimización y validación de una qPCR ADNk.....	98
3.6.3.2.	Realización de la curva patrón y cálculo de la sensibilidad	98
3.6.3.3.	Análisis de datos	99
3.7.	Estudio molecular de las preferencias alimentarias en hembras de flebotomo con sangre ingerida.....	99
3.7.1.	Amplificación de <i>cytb</i>	99
3.7.2.	PCR-RFLP <i>cytb</i>	100
3.8.	Análisis bioestadístico	101
4.	RESULTADOS	105
4.1.	Capturas globales de flebotomos	105
4.2.	Capturas mediante trampas adhesivas	105
4.2.1.	Diversidad de especies	105
4.2.2.	Flebotomos capturados en cada estación	105
4.2.4.	Densidad de flebotomos por estación	108
4.2.5.	Relación machos/hembras.....	109
4.3.	Capturas mediante trampas de luz.....	111
4.3.1.	Diversidad de especies	111

4.3.2.	Flebotomos capturados en cada estación	111
4.3.3.	Flebotomos capturados en cada punto de muestreo de las diferentes estaciones	113
4.3.4.	Flebotomos capturados cada noche	116
4.3.5.	Abundancia relativa.....	116
4.3.5.1.	Abundancia relativa por periodo de muestreo.....	116
4.3.5.2.	Abundancia relativa por estación.....	117
4.3.6.	Relación machos/hembras.....	117
4.4.	Factores climáticos	122
4.4.1.	Temperatura	122
4.4.1.1.	Temperatura media	122
4.4.1.2.	Temperatura máxima	125
4.4.1.3.	Temperatura mínima	128
4.4.2.	Humedad relativa	131
4.4.2.1.	Humedad relativa media.....	131
4.4.2.2.	Humedad relativa máxima	134
4.4.2.3.	Humedad relativa mínima.....	137
4.5.	Fenología	139
4.5.1.	Trampas adhesivas.....	139
4.5.1.1.	Valores de densidad.....	141
4.5.2.	Trampas de luz	144
4.5.3.	Relación entre los flebotomos capturados y los parámetros climáticos ...	146
4.5.3.1.	Relación entre flebotomos capturados y los valores registrados de temperatura	149
4.5.3.1.1.	Capturas totales	149
4.5.3.1.2.	Flebotomos capturados mediante trampas adhesivas	149
4.5.3.1.3.	Flebotomos capturados mediante trampas de luz.....	150
4.5.3.2.	Relación entre flebotomos capturados y los valores de humedad relativa.....	152
4.5.3.2.1.	Capturas totales	152

4.5.3.2.2.	Flebotomos capturados mediante trampas adhesivas	152
4.5.3.2.3.	Flebotomos capturados mediante trampas de luz.....	153
4.6.	Aislamiento y caracterización de aislados de <i>Leishmania</i>	155
4.6.1.	Tasas de infección	155
4.6.1.1.	Relación de la tasa de infección con los valores de densidad, el número de <i>P. perniciosus</i> capturado mediante trampas de luz y los parámetros climáticos.....	157
4.6.2.	Caracterización de los aislados mediante amplificación de las regiones ITS1 e ITS2.....	157
4.7.	Detección de <i>L. infantum</i> mediante métodos moleculares.....	158
4.7.1.	<i>P. perniciosus</i> positivos a <i>L. infantum</i> en cada periodo de muestreo y estación.....	159
4.8.	Optimización y validación de una qPCR para la detección y cuantificación de <i>Leishmania</i> en <i>P. perniciosus</i>	161
4.8.1.	Optimización	161
4.8.2.	Curva patrón	161
4.8.3.	Análisis de muestras	163
4.9.	Detección de <i>Trypanosoma</i> spp. en <i>P. perniciosus</i>	165
4.9.1.	Caracterización molecular.....	167
4.10.	Determinación de preferencias alimentarias en flebotomos	171
4.10.1.	Preferencias alimentarias determinadas por periodo y estación de muestreo.....	171
4.10.2.	Detección de <i>L. infantum</i> en hembras con sangre	174
4.10.3.	PCR-RFLP para la discriminación de las fuentes de alimentación	174
5.	DISCUSIÓN	181
5.1.	Los flebotomos del área del brote de leishmaniosis humana del suroeste de la Comunidad de Madrid	181
5.2.	Dinámica estacional de los flebotomos y su relación con los parámetros climáticos	185
5.3.	Identificación de las preferencias alimentarias de los flebotomos del área del brote.....	187

5.4.	Determinación de las tasas de infección en <i>P. perniciosus</i>	191
5.5.	Detección y cuantificación de <i>L. infantum</i> en <i>P. perniciosus</i>	194
5.6.	Detección de <i>T. nabiasi</i> en hembras de <i>P. perniciosus</i>	196
6.	CONCLUSIONES	201
7.	BIBLIOGRAFÍA	205
8.	ANEXO 1	259
9.	ANEXO 2	274
9.1.	Secuencias ITS1 de <i>T. nabiasi</i>	274
9.2.	Secuencias ARNr SSU de <i>T. nabiasi</i>	275
10.	APÉNDICE	281
10.1.	Abreviaturas.....	281
10.2.	Índice de figuras.....	286
10.3.	Índice de tablas	295
10.4.	Publicaciones.....	298

RESUMEN

Estudios entomológicos en el foco de leishmaniosis del suroeste de la Comunidad de Madrid

La leishmaniosis está causada por protozoos flagelados del género *Leishmania*, distribuyéndose por zonas tropicales y subtropicales y afectando a 98 países en 5 continentes. Esta enfermedad puede afectar tanto a humanos como otros vertebrados, siendo un importante problema de salud pública en lugares de África, Asia, América Latina y sur de Europa. La leishmaniosis se engloba dentro de las enfermedades transmitidas por vectores, puesto que se transmite a través de la picadura de las hembras de flebotomos cuando se alimentan de la sangre de algún vertebrado. Además, es considerada una enfermedad tropical desatendida debido a su complejidad ecológica y epidemiológica, a la dificultad en el manejo de los casos, su mayor incidencia en la población más pobre de los países en desarrollo y a la falta de datos precisos sobre su extensión y distribución.

En España sólo está presente una especie del parásito, *Leishmania infantum*, y se distribuye por gran parte del territorio peninsular, afectando principalmente a las regiones mediterráneas, sur y central. A mediados del 2010 se detectó un aumento de los casos de leishmaniosis humana en la región suroeste de la Comunidad de Madrid, habiéndose notificado hasta la fecha más de 700 casos, que ha dado lugar al mayor brote de leishmaniosis humana en Europa. Esta región ha sufrido importantes cambios en su entorno debido la creación de dos grandes Parques Forestales limítrofes a municipios con una elevada densidad de población, que han propiciado el aumento de las poblaciones de conejos, liebres y también de flebotomos, y han favorecido la transmisión del parásito. El brote ha afectado principalmente a los residentes de Fuenlabrada, municipio donde se ha llegado a alcanzar una incidencia de 52,7 casos por cada 100.000 habitantes, y a otros tres municipios colindantes: Leganés, Getafe y Humanes de Madrid.

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido la realización de un estudio exhaustivo del ciclo biológico de *L. infantum* en la zona, prestando especial atención a los aspectos entomológicos de la transmisión. Para ello, entre los años 2012-2014, se realizaron muestreos mensuales durante el periodo de actividad de los flebotomos, de junio a octubre, utilizando trampas adhesivas y trampas de luz tipo CDC. Las capturas se realizaron en 4 estaciones de muestreo, localizadas en Fuenlabrada y Leganés, durante dos noches consecutivas. De esta manera se ha llevado a cabo el estudio de la abundancia, distribución y dinámica estacional de las especies de flebotomos; y la determinación de las tasas de infección, la determinación de las cargas parasitarias y la identificación de las preferencias alimentarias en *Phlebotomus perniciosus*.

Los resultados de los muestreos realizados muestran la presencia de cuatro especies de flebotomos: *P. perniciosus*, *Sergentomyia minuta*, *Phlebotomus sergenti* y *Phlebotomus papatasi*. La especie predominante es *P. perniciosus*, seguida de *S. minuta*. Los

resultados obtenidos revelan que la única especie de flebotomo implicada en la transmisión de *L. infantum* en el brote es *P. perniciosus*, cuyos elevados valores de densidad y abundancia relativa son indicativos de un riesgo de transmisión excepcionalmente alto.

Por otro lado, las fluctuaciones de cada especie a lo largo de los tres periodos de muestreo han sido diferentes. Mientras que *P. perniciosus* presenta predominantemente un patrón bimodal confluyente, *S. minuta* muestra un modelo monomodal. Así mismo, la dinámica estacional de estas dos especies se ha visto influida por la temperatura y humedad relativa de la zona.

El estudio de las tasas de infección muestra valores elevados, tanto mediante disección de las hembras de *P. perniciosus* como mediante métodos moleculares. Además, la cuantificación de la carga parasitaria, mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa optimizada en el laboratorio, ha permitido confirmar la presencia de elevadas cargas parasitarias en las hembras de *P. perniciosus* infectadas. Todos estos hallazgos ratifican la alta intensidad de transmisión de *L. infantum* en el brote.

Mediante técnicas moleculares se ha notificado por primera vez la presencia del tripanosoma del conejo, *Trypanosoma nabiasi*, en flebotomos. La detección de ADN de este parásito en hembras de *P. perniciosus* alimentadas de sangre de conejo capturadas en área del brote sugiere la posible implicación de estos dípteros en su transmisión.

El estudio de las preferencias alimentarias mediante la amplificación y la secuenciación de un fragmento conservado del gen de citocromo *b* (*cytb*) ha demostrado que las hembras de *P. perniciosus* se alimentan preferentemente de conejos y liebres, confirmando el importante papel que estos lagomorfos juegan en el ciclo de *L. infantum* en el área del brote. Además, se han encontrado hembras de esta especie alimentadas de gato, humano y perro; mientras que las hembras de *S. minuta* analizadas solamente presentaban sangre de salamandras. Por otro lado, se ha diseñado y optimizado una técnica de PCR seguida del estudio de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción del gen del *cytb* mediante la digestión de los productos amplificados con las enzimas de restricción *HaeIII* y *HinfI*. Los resultados demuestran que esta técnica, en la que se analizan los patrones de bandas diagnósticas obtenidos, es una opción funcional para la discriminación de las fuentes de alimentación en flebotomos, sirviendo de alternativa a técnicas más complejas y costosas económicamente como la secuenciación.

Como conclusión final, el trabajo llevado a cabo en la presente Tesis se muestra como el estudio entomológico más exhaustivo y completo realizado en el mayor brote de leishmaniosis registrado en Europa. La combinación de técnicas biológicas clásicas y moleculares ha demostrado ser una estrategia eficaz en la descripción de las características de las poblaciones de flebotomos presentes en la zona del brote, de sus fluctuaciones estacionales, de las tasas de infección y de las preferencias alimentarias.

SUMMARY

Entomological studies on the outbreak of leishmaniasis in the southwest of the Community of Madrid

Leishmaniasis is caused by flagellated protozoa of the genus *Leishmania* and is distributed in tropical and subtropical zones, affecting 98 countries on 5 continents. This disease can affect both humans and other vertebrates, and is a major public health problem in regions of Africa, Asia, Latin America and southern Europe. Leishmaniasis is a vector-borne disease, since it is transmitted through the bite of female sand flies when they feed on a vertebrate. In addition, it is considered a neglected tropical disease due to its ecological and epidemiological complexity, difficulty in case management, increased incidence in the poorest populations of developing countries and lack of accurate data on its extent and distribution.

Leishmania infantum is the only species of the parasite present in Spain and it is distributed over a large part of the peninsular territory, mainly affecting the Mediterranean, southern and central regions. In mid-2010, an increase in human leishmaniasis cases was detected in the southwestern region of the Community of Madrid with more than 700 cases reported to date, which has led to the largest outbreak of human leishmaniasis in Europe. This region has undergone important changes in its environment due to the creation of two large green areas, bordering municipalities with a high population density, promoting the increase in the population of rabbits, hares and also sand flies, which has favored the transmission of the parasite. The outbreak has mainly affected the residents of Fuenlabrada, where it has reached an incidence of 52.7 cases per 100,000 inhabitants, and three other neighbouring municipalities, Leganés, Getafe, and Humanes de Madrid.

The main objective of this Doctoral Thesis was to carry out an exhaustive study of the biological cycle of *L. infantum* in the area, paying special attention to the entomological aspects of transmission. To this end, between 2012 and 2014, monthly collections were conducted during the sand fly activity period—from June to October—using sticky traps and CDC-type light traps. The catches were taken in 4 sampling stations, located in Fuenlabrada and Leganés, during two consecutive nights. In this way, the study of the abundance, the distribution and the seasonal dynamics of sand fly species have been carried out in *Phlebotomus perniciosus* sand flies, as well as the determination of infection rates, the estimation of parasite loads and the identification of bloodmeal preferences.

The results of the surveys show the presence of four sand fly species: *P. perniciosus*, *Sergentomyia minuta*, *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus papatasi*. The predominant species is *P. perniciosus*, followed by *S. minuta*. Thus, the results reveal that the only sand fly species involved in the transmission of *L. infantum* in the outbreak is *P. perniciosus*, whose high density and relative abundance values are indicative of an exceptionally high risk of transmission.

On the other hand, the fluctuations of each species over the three sampling periods have been different. While *P. perniciosus* has a predominantly bimodal confluent pattern, *S. minuta* shows a monomodal pattern. Likewise, the seasonal dynamics of these two species have been shown to be influenced by the temperature and relative humidity present in the area.

The study of infection rates shows high values both by dissection of *P. perniciosus* females and by molecular methods. In addition, the estimation of parasite loads by the optimized quantitative polymerase chain reaction has confirmed the presence of high parasite loads in the infected *P. perniciosus* females. All these findings confirm the high intensity of transmission of *L. infantum* in the outbreak.

The presence of rabbit trypanosome, *Trypanosoma nabiasi*, in sand flies has been reported for the first time using molecular techniques. DNA detection of this parasite in females of *P. perniciosus* fed on rabbit captured in the outbreak area suggests the possible involvement of these dipterans in its transmission.

Results on the study of bloodmeal preferences by amplification and sequencing of a conserved fragment of the cytochrome *b* (*cytb*) gene have shown that *P. perniciosus* females have fed primarily on rabbits and hares, confirming the important role that these lagomorphs play in the *L. infantum* cycle in the outbreak area. In addition, females of this species were found to be fed on cat, human and dog, while the tested *S. minuta* females presented only gecko blood. On the other hand, a PCR technique followed by the study of restriction fragments length polymorphisms of *cytb* gene has been designed and optimized by the digestion of amplified products with the restriction enzymes *HaeIII* and *HinfI*. The results show that this technique, in which the obtained diagnostic band patterns are analyzed, is a functional option for the discrimination of blood meal sources in sand flies, serving as an alternative to more complex and economically expensive techniques such as sequencing.

As a final conclusion, the work carried out in this Thesis is the most exhaustive and complete entomological study carried out in the largest outbreak of human leishmaniasis in Europe. The combination of classical and molecular techniques has proven to be an effective strategy for describing the populations of sand flies present in the outbreak area, their seasonal fluctuations, the infection rates and bloodmeal preferences.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Leishmaniosis

1.1.1. Aspectos generales

La leishmaniosis engloba un grupo de enfermedades causadas por protozoos flagelados pertenecientes al género *Leishmania*. Se distribuye por zonas tropicales y subtropicales, llegando a afectar a 98 países en 5 continentes. Esta enfermedad puede afectar tanto a humanos como a otros animales, y representa un serio problema de salud pública en lugares de África, Asia, América Latina y sur de Europa. La OMS calcula una prevalencia de 12 millones de afectados y una población de 350 millones de personas en riesgo de padecerla, aunque se considera que los datos oficiales podrían ser bastante inferiores a los reales debido a la subestimación y a la falta de registros de los casos en algunos países (OMS 2010; Alvar y col., 2012). Se trata de una enfermedad muy ligada a la pobreza y a los movimientos migratorios de personas entre países, consecuencia de la inmigración y los desplazamientos de refugiados provocados por conflictos armados (Alvar y col., 2006; Okwor y Uzonna, 2016). Estas características sitúan a la leishmaniosis como una de las enfermedades infecciosas más importantes y la segunda enfermedad parasitaria que más muertes causa. Debido a la complejidad ecológica y epidemiológica de la enfermedad, la dificultad en el manejo de los casos, su mayor incidencia entre la población más pobre de los países en desarrollo, junto con la falta de datos exactos sobre su extensión y distribución, esta enfermedad forma parte del grupo de enfermedades tropicales desatendidas (NTD, *neglected tropical diseases*).

La leishmaniosis es una enfermedad transmitida por vectores (VBD, *vector borne diseases*), ya que se transmite a través de la picadura de las hembras de flebotomo cuando se alimentan de la sangre de algún vertebrado. Aunque los flebotomos son los vectores probados, algunas especies de *Leishmania* del subgénero *Mundinia*, recientemente descritas, parecen ser transmitidas por otros dípteros. Concretamente se sospecha de dípteros cerapotogónidos, los cuales parecen estar involucrados en la transmisión de *Leishmania (M.) macropodum* entre los canguros rojos de Australia (Dougall y col., 2009). Así mismo, Seblova y col., 2015 demostraron el desarrollo de formas infectivas de *Leishmania (M.) enriettii* en *Culicoides sonorensis*. Además de la transmisión vectorial, se pueden dar otras vías de transmisión mucho menos frecuentes, como son la infección mediante la transfusión de componentes sanguíneos u órganos procedentes de donantes portadores del parásito (Cohen y col., 1991; Antinori y col., 2008; França et al., 2018), la transmisión transplacentaria (Díaz-Espiñeira y Slappendel, 1997; Meinecke y col., 1999; Rosypal y col., 2005; Da Silva y col., 2009), la transmisión vía parenteral por uso compartido de jeringas entre consumidores de drogas (Alvar y Jimenez, 1994; Cruz y col., 2002a), la transmisión venérea (Silva y col., 2009) e incluso se sugiere la transmisión directa entre perros a través de mordeduras (Naucke y col., 2016). El ciclo habitual de este parásito tiene lugar en dos hospedadores: el flebotomo, que actúa como vector, y el hospedador vertebrado. En ambos tiene lugar la

Introducción

multiplicación del parásito, difiriendo en que en el hospedador vertebrado se multiplican los amastigotes, sin flagelo funcional, dentro de los macrófagos; mientras que en el flebotomo los macrófagos ingeridos al alimentarse de la sangre de un vertebrado infectado, se lisan y liberan amastigotes en el tubo digestivo del díptero. Dentro de éste, los amastigotes se transforman en las formas flageladas, los promastigotes, que se multiplican y transforman hasta dar lugar finalmente a la forma infectiva, los promastigotes metacíclicos (Figura 1).

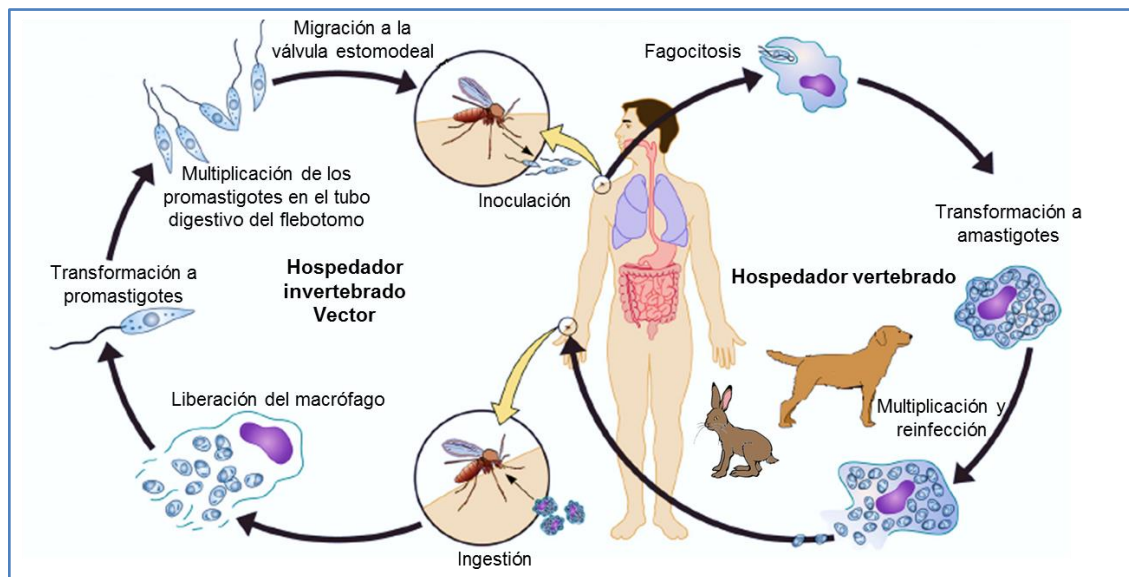


Figura 1. Ciclo de *Leishmania* en el flebotomo y en el hospedador vertebrado. Fuente: modificado de Esch y Petersen, 2013.

Más de 20 especies de *Leishmania* pueden ser causantes de la enfermedad, cuya clínica varía dependiendo de la virulencia de la especie, del estado inmunológico de la persona afectada y de su respuesta inmune frente al parásito (OMS, 2010). Las manifestaciones clínicas que se observan en humanos son diversas y van desde la leishmaniosis cutánea (LC), en la que aparecen lesiones en la piel normalmente autolimitantes, a la leishmaniosis visceral (LV), que puede ser letal en caso de no ser tratada. Existen otras variantes como la leishmaniosis cutánea difusa, la leishmaniosis mucocutánea y la leishmaniosis cutánea poskala-azar (PKDL, *post-kala-azar dermal leishmaniasis*) (OMS, 2010; Desjeux, 2004) (Figura 2).



Figura 2. Manifestaciones clínicas de la leishmaniosis. **A)** Lesión cutánea característica de la LC; **B)** leishmaniosis mucocutánea; **C)** leishmaniosis cutánea difusa; **D)** PKDL; **E)** hepatoesplenomegalia debida a LV. Fuentes: A, Aguado y col., 2013; B, Chappuis y col., 2007; C y E, Gradoni y col., 2017.

Algunas especies pueden afectar tanto a humanos como a otros vertebrados, pudiendo existir diversos hospedadores involucrados en el ciclo, dando lugar a una zoonosis. Otras especies sólo afectan a humanos, tratándose entonces de una antroponosis. Incluso algunas especies pueden englobarse en ambas categorías. Existen ciclos que afectan sólo a animales silvestres (ciclo silvestre), a animales domésticos (ciclo doméstico) o a humanos (ciclo antroponótico). A su vez, estos ciclos pueden interactuar entre sí, ampliándose la transmisión del parásito (Figura 3). Las especies de *Leishmania* consideradas causantes de antroponosis son *Leishmania donovani*, que ocasiona LV, y *Leishmania tropica*, que causa LC (OMS, 2010). En determinadas circunstancias *L. infantum* también puede encontrarse en ciclos estrictamente antroponóticos al transmitirse a través de jeringas entre personas consumidoras de drogas por vía parenteral (Alvar y Jiménez, 1994; OMS, 2010).

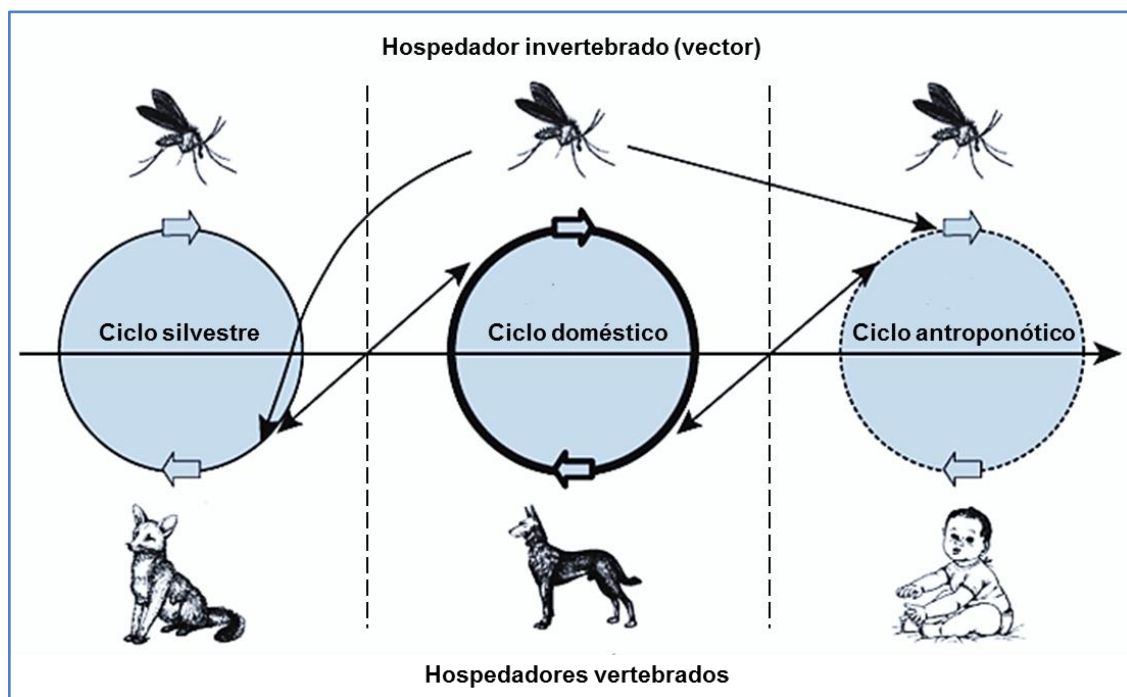


Figura 3. Diferentes ciclos de leishmaniasis e interacción entre ellos. Fuente: modificado de Léger y Depaquit, 1999.

Los estudios existentes estiman que más del 90% de los casos de LV se dan en seis países: India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía y Brasil (Figura 4A); mientras que la LC se distribuye en un mayor número de países, repartiéndose principalmente en tres regiones: América, cuenca mediterránea y la región comprendida desde Asia del Este, Oriente Medio y Asia Central (Figura 4B) (Alvar y col., 2012). En Europa, el 75 % de los casos de leishmaniasis se producen en Albania, Georgia, Italia y España, y el total de la incidencia en este continente representa el 2% de la carga global mundial (Ejov y Dagne, 2014).

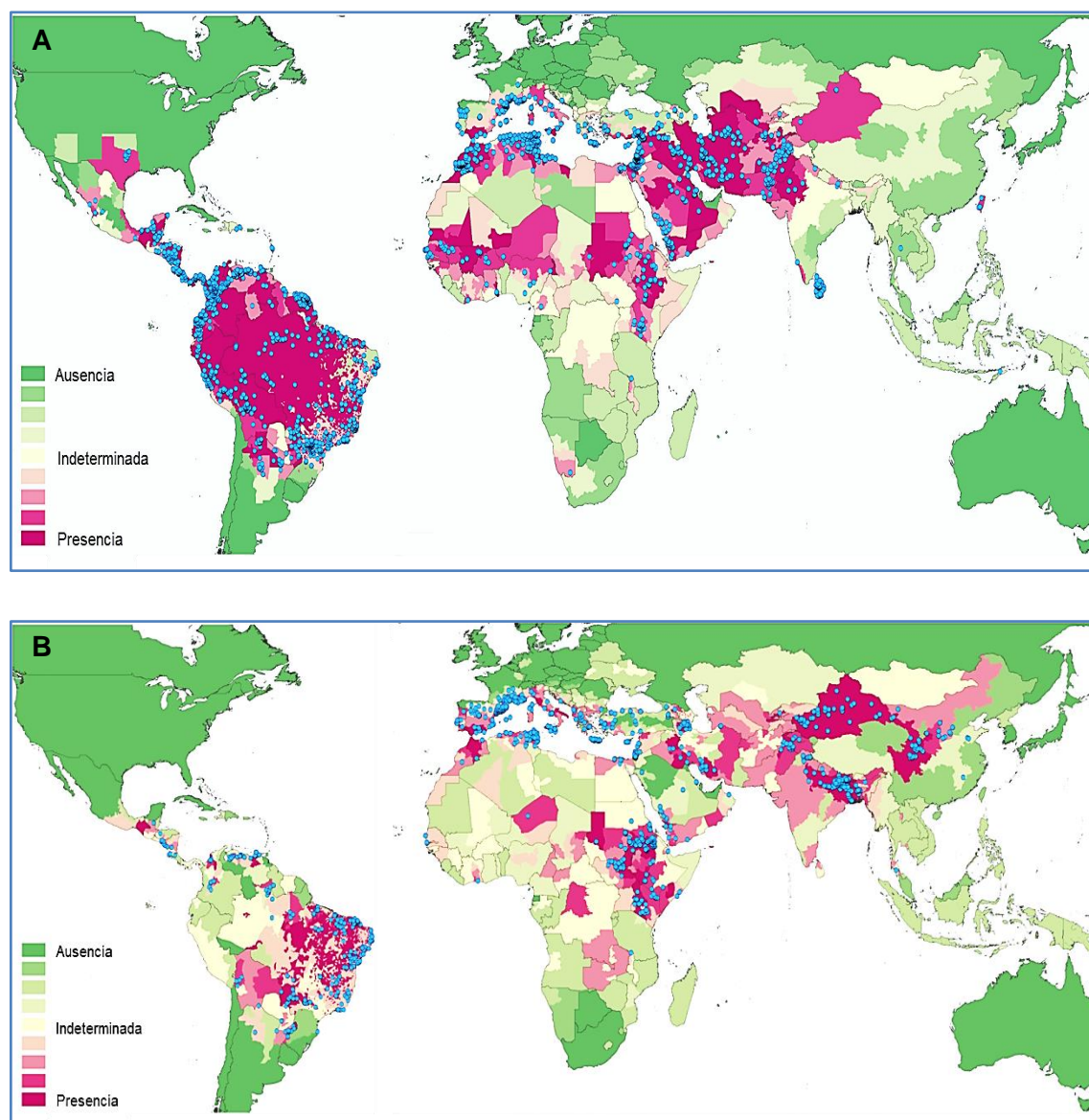


Figura 4. Distribución de la LV (A) y la LC (B) a nivel mundial. Los puntos azules indican puntos de incidencia o casos dentro de pequeños núcleos habitados. Fuente: modificado de Pigott y col., 2014.

Numerosos animales, entre ellos el hombre, pueden ser reservorios de la leishmaniosis. Se conoce como reservorio aquel animal que garantiza tanto la presencia del agente etiológico como su posterior transmisión (OMS, 2010). Por lo general, en un foco particular de leishmaniosis se suele encontrar un reservorio principal o primario, responsable de que el parásito se mantenga de manera indefinida en el área. Pero en la misma zona pueden verse infectados otros vertebrados, que constituyen reservorios secundarios, los cuales pueden estar infectados por el parásito pero no son capaces de mantener una transmisión estable en ausencia del reservorio primario. Además, pueden existir reservorios accidentales, que serían aquellos animales en los que se detecta el parásito pero que no participan de ninguna manera en el ciclo de transmisión del mismo (Quinnell y Courtenay, 2009; Maia y col., 2018). Los animales infectados por *Leishmania* pueden presentar o no signos evidentes de infección. Puede ocurrir que el animal

presente relativamente pocos amastigotes en piel o en vísceras, por lo que su respuesta es mínima o indetectable. Sin embargo, otros animales como el perro, considerado el reservorio principal de la LV causada por *L. infantum*, pueden sucumbir a la infección. El simple hecho de detectar el parásito en un vertebrado, aunque sea en numerosos individuos, no lo incrimina automáticamente como reservorio. Para ello es necesario demostrar los criterios siguientes (Ashford, 1996; OMS, 2010):

- El reservorio debe encontrarse en una densidad lo suficientemente alta y vivir lo bastante como para proporcionar a los flebotomos vectores una fuente significativa de alimento.
- Es necesario un contacto intenso entre el hospedador y los flebotomos.
- La proporción de hospedadores que adquieren el parásito a lo largo de su vida debe ser considerable.
- El reservorio debe mantener la infección el tiempo suficiente para que los parásitos sobrevivan y puedan ser transmitidos nuevamente.
- Los reservorios deben presentar una cantidad de parásitos suficiente en piel o en sangre para que puedan transmitirse al flebotomo.

En el caso de las antroponosis causadas por *L. donovani* y *L. tropica*, el único reservorio implicado es el humano. Sin embargo, se ha venido detectando la presencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) o anticuerpos frente a estas especies en una amplia variedad de animales, la mayoría de ellos dentro del entorno doméstico, como burros, cabras, gatos, ovejas, perros y vacas (Dereure y col., 1991, 2000, 2003; Mukhtar y col., 2000; Hassan y col., 2009; Baneth y col., 2014; Hajjarian y col., 2013; Ntais y col., 2014; Bamorovat y col., 2015; Can y col., 2016), y también en animales silvestres como damanes, mangostas, murciélagos o roedores (Elinaiem y col., 2001; Svobodova y col., 2006; Talmi-Frank y col., 2010; Kassahun y col., 2015; Lemma y col., 2017), que podrían estar implicados en el mantenimiento del ciclo del parásito, aunque hasta el momento no existen estudios que demuestren su implicación. En cuanto a las zoonosis los reservorios implicados dependen de la especie de *Leishmania* y del entorno donde tengan lugar. Numerosos estudios han detectado la presencia del parásito en una amplia variedad de órdenes de vertebrados repartidos por el Viejo y por el Nuevo Mundo: Carnivora (cánidos, felinos, vivérridos), Chiroptera (murciélagos), Cingulata (armadillos), Didelphimorphia (zarigüeyas), Diprotodontia (wallabies), Eulipotyda (erizos), Lagomorpha (conejos y liebres), Pilosa (osos hormigueros), Primata y Rodentia. Algunos de estos animales han sido confirmados como reservorios de alguna especie de *Leishmania*, mientras que en otros simplemente se ha detectado el parásito sin haber podido determinarse su implicación en el mantenimiento del ciclo (Lainson y col., 1989; Lainson y Shaw, 1989; Ashford, 1996; Quinnell y Courtenay, 2009; Savani y col., 2010; Marcelino y col., 2011; Carreira y col., 2012; Molina y col., 2012; Shapiro y col., 2013; Jiménez y col., 2014; Millán y col., 2014; Roque y Jansen, 2014; Chemkhi y col., 2015; Lara-Silva y col., 2015; Ebani y col., 2016; Montoya y col., 2016; Caldart y col., 2017; Gómez-Hernández y col., 2017; Pereira y col., 2017).

1.1.2. Posición taxonómica de *Leishmania*

Los parásitos causantes de la leishmaniosis han evolucionado a partir de flagelados parásitos de insectos, de ciclo monoxeno, hasta convertirse en formas con un ciclo digénico complejo que se alterna entre el flebotomo vector y el hospedador vertebrado (Maslov y col., 2013). El género *Leishmania* (Ross 1903) se engloba dentro del reino Protista y en la clase Kinetoplastea por la presencia del kinetoplasto, consistente en una mitocondria única que contiene una gran cantidad de ADN (Lukes y col., 2002). Se agrupa en la familia Trypanosomatidae, en la que también se encuentra el género *Trypanosoma* que, junto con el género *Leishmania*, son los dos tripanosomátidos

- Reino PROTOZOA (Cavalier-Smith 2002)
 - Subreino EOZOA (Ruggiero 2015)
 - Filo EUGLENOZOA (Cavalier-Smith 2003)
 - Clase KINETOPLASTEA (Cavalier-Smith 1998)
 - Orden TRYPANOSOMATIDA (Kent 1880)
 - Familia TRYPANOSOMATIDAE (Doflein 1901)
 - Género *Leishmania* (Ross 1903)

digénicos con especies patógenas que afectan a humanos (Figura 5).

Figura 5. Clasificación taxonómica del género *Leishmania*. Fuente: modificado de Ruggiero y col., 2015; Mauricio, 2018.

Las primeras clasificaciones se basaron en caracteres extrínsecos como la clínica, distribución geográfica o características biológicas, pero resultan complejas y poco precisas en algunos casos (Adler, 1964). En 1976, Vickerman propuso 4 géneros: “complejo donovani”, “complejo tropica”, “complejo mexicana” y “complejo braziliensis”. Tres años más tarde, Lainson y col., 1979 propusieron tres grupos, atendiendo a la localización de los parásitos en el tubo digestivo de los flebotomos: Hipopilaria, Peripilaria y Suprapilaria (ver apartado 1.2.7). En 1987, Lainson y Shaw, describieron dos subgéneros: *Leishmania* (*Leishmania*) para las especies englobadas en el grupo Suprapilaria, y *Leishmania* (*Viannia*) para el grupo Peripilaria. Las especies del segundo subgénero se encuentran sólo en el Nuevo Mundo, mientras que las del primero se encuentran tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo. A partir de los años 80, la aparición de las herramientas moleculares mostró que los caracteres extrínsecos podían no ser adecuados para la clasificación y que se debían tener en cuenta otras características como patrones de polimorfismos de marcadores, como el ADN del kinetoplasto (ADNk), proteínas o antígenos (Chance y col., 1974; Kreutzer y Christensen, 1980; Simpson y col., 1980; Arnot y Barker, 1981; Miles y col., 1981; Pratt y David, 1981; De Ibarra y col., 1982; Wirth y Pratt, 1982; Anthony y col., 1985; Barker y col., 1986; Bañuls y col., 2007). Posteriormente, se ha propuesto una nueva clasificación basada en estudios moleculares, con dos líneas filogenéticas: Euleishmania y Paraleishmania (Cupolillo y col., 2000). La primera línea engloba cuatro subgéneros (*Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* y *Mundinia*) y la segunda engloba 5 especies (*Leishmania hertigi*, *Leishmania deanei*, *Leishmania herreri*, *Leishmania equatorensis* y *Leishmania colombiensis*) y los géneros *Endotrypanum* y *Porcisia* (Espinosa y col., 2016). Actualmente están descritas 54 especies de *Leishmania* (excluyendo las especies sinónimas), de las cuales 20 son patógenas para el ser humano (Figura 6).

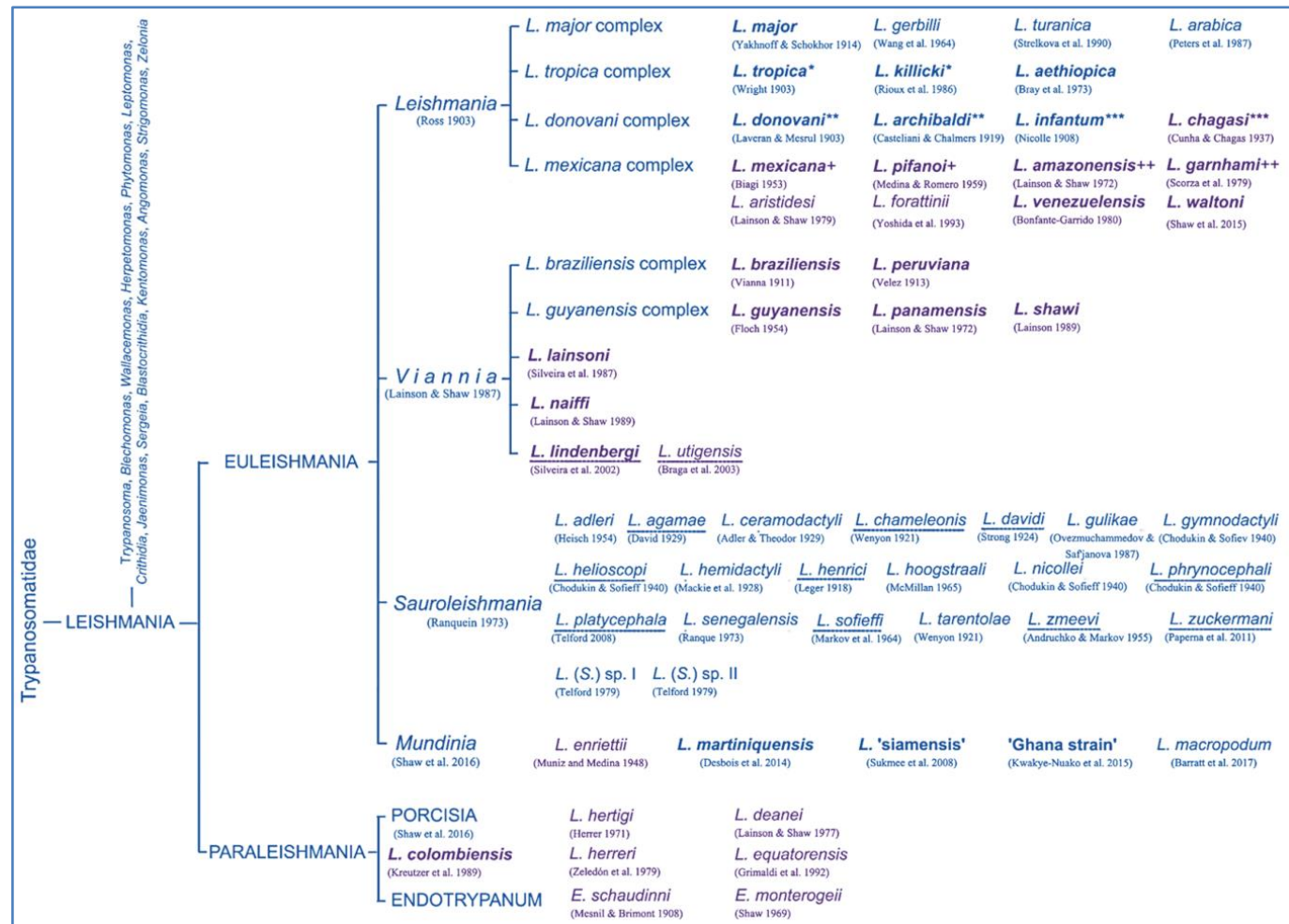


Figura 6. Clasificación taxonómica del género *Leishmania*. Fuente: modificado de la página web del Instituto de Investigación para el Desarrollo de Francia (*Institut de recherche pour le développement*) (<http://leishmania.ird.fr/#>). Las especies pertenecientes al Viejo Mundo se indican en color azul y las del Nuevo Mundo en violeta. Los nombres en negrita indican las especies patógenas para el ser humano. Los nombres entre comillas hacen referencia a nombre no oficiales sin descripciones formales; *Leishmania "siamensis"* y *Leishmania martiniquensis* también han sido encontradas en el Nuevo Mundo. Las especies sinónimas están señaladas con diferente número de (*) y (+). Subrayado: especies cuya clasificación no es definitiva.

1.1.3. Métodos de caracterización

La identificación de la especie de *Leishmania* que circula en una región es imprescindible para elaborar un plan de control adecuado (OMS, 2010). Además, el aumento del desplazamiento de personas entre diferentes zonas, ya sea por turismo, emigración o conflictos armados, conducen a la aparición inesperada de especies de *Leishmania* en nuevas regiones (Di Muccio y col., 2015).

El método de referencia o *gold* estándar para la caracterización de las especies de *Leishmania* ha sido la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE, *multilocus enzyme electrophoresis*), también denominada caracterización isoenzimática. En este método se analiza un grupo de isoenzimas que dará lugar a un patrón de movilidad característico en cada proteína y cuya combinación permite agrupar la especie o cepa de *Leishmania* en un determinado zimodema, permitiendo la diferenciación de especies y su clasificación en niveles inferiores (Pratlong y col., 2009, 2013). Esta técnica ha sido utilizada para la caracterización de aislados de flebotomos, hospedadores o sujetos, permitiendo la descripción de los ciclos de transmisión presentes en áreas endémicas de leishmaniosis (Schlein y col., 1984; Gradoni y col., 1991; Jiménez y col., 1995a; Martín-Sánchez y col., 2004; Chicharro y col., 2002; Pratlong y col., 2004; Campino y col., 2006; Haouas y col., 2012) y de la distribución de diferentes especies de *Leishmania* (Le Blancq y col., 1986a, 1986b; Le Blancq y Peters, 1986; Pratlong y col., 2009, 2013). A pesar de su enorme utilidad, el MLEE es una técnica laboriosa, que consume mucho tiempo y necesita de personal muy experimentado, además de requerir el uso de cepas control que permitan la comparación de los resultados obtenidos con la muestra problema. Así mismo, presenta otros inconvenientes como la dificultad de comparar especies de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo al utilizarse paneles de isoenzimas diferentes (Rioux, 1990; Cupolillo y col., 1994). También pueden existir zimodemas fenotípicamente indistinguibles producidos por diferentes genotipos (Mauricio y col., 2006; Alam y col., 2009), o variaciones en las movilidades electroforéticas debidas a la heterocigosidad en la posición de un solo nucleótido (Jamjoom y col., 2004) o que no son consecuencia de la diversidad de nucleótidos del gen en particular (Mauricio y col., 2006; Zemanová y col., 2007). Todos estos inconvenientes han propiciado el desarrollo de nuevas técnicas moleculares, la mayoría de ellas ligadas a técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

Las dianas utilizadas para la caracterización molecular de *Leishmania* deben ser secuencias que permitan la discriminación entre el mayor número de especies posible. De manera general, una técnica de genotipado debería cumplir los siguientes requisitos (revisado por Van der Auwera y Dujardin, 2015):

- 1) Discriminar entre las diferentes especies.
- 2) Ser aplicable globalmente o al menos a las especies presentes en la región objeto del estudio.
- 3) Ser lo suficientemente sensible como para identificar la especie de *Leishmania* en aquellas muestras en las que no sea posible aislar y cultivar el parásito.

- 4) Ser específica del género *Leishmania*, evitando reacciones cruzadas con otros microorganismos.
- 5) Ser fácil de estandarizar y ser reproducible en otros laboratorios.
- 6) Poder llevarse a cabo con los recursos disponibles en esa región.
- 7) Estar validada.

Se ha desarrollado un amplio abanico de metodologías en las que se utilizan una gran variedad de dianas presentes, tanto en el ADN cromosómico como en el extracromosómico de *Leishmania*. Dentro de las dianas presentes en el ADN cromosómico, se encuentran:

- ADN ribosomal: los genes de esta región se localizan en el cromosoma 27 y se presentan en un número alto de repeticiones (Yan y col., 1999). Dentro de los diferentes componentes de estos genes, las dianas más utilizadas son las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS, *internal transcribed spacer*). Estas regiones están formadas por ADN no codificante localizado entre la subunidad pequeña (SSU, *small subunit*) y la subunidad grande (LSU, *large subunit*) del ADN ribosomal (ADNr). Son regiones altamente variables que se vienen utilizando para el genotipado de las especies de *Leishmania* y que se diferencian en dos regiones: ITS1, con una longitud de 50-350 pares de bases (pb), localizada entre los genes 18S y 5.8S del ADNr (Schönian y col., 2003); y la región ITS2, con una longitud de 50-650 pb, localizada entre el gen 5.8S y los genes de la LSU (Figura 7). Los cebadores utilizados para la diferenciación de las especies de *Leishmania* fueron originariamente descritos por El Tai y col., 2000, y se han aplicado en diferentes métodos como la reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP, *polymerase chain reaction-restriction fragment lenght polymorphism*) (Schönian y col., 2003), PCR anidada (Cruz y col., 2002b), qPCR (Toz y col., 2013), diferenciación de temperatura de *melting* mediante análisis de alta resolución de fusión (HRM, *high resolution melting*) (Talmi-frank y col., 2010; Hernández y col., 2014), uso de sondas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*) (Tsukayama y col., 2013; Nath-Chowdhury y col., 2016) y secuenciación (El Tai y col., 2001; Kuhls y col., 2005; De Almeida y col., 2011).

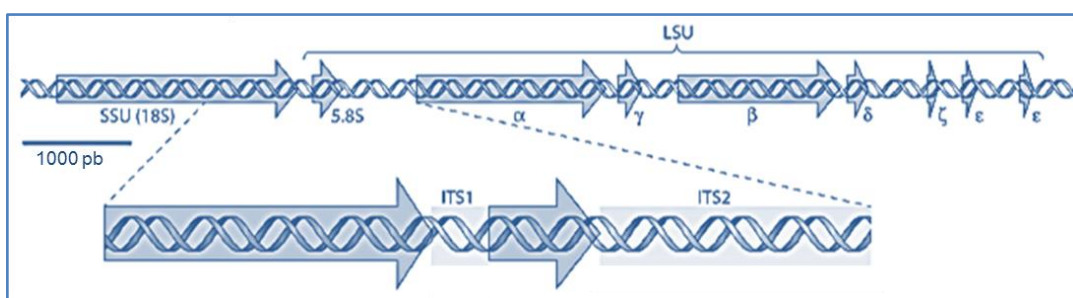


Figura 7. Región del ADNr donde se localizan las dianas moleculares de las regiones ITS. Fuente: modificado de Van der Auwera y Dujardin, 2015.

- Genes codificantes de proteínas: incluye genes de copia única y de copia múltiple. Entre los genes más utilizados para la caracterización de *Leishmania* se encuentran los genes codificantes para las proteínas de choque térmico (Hsp, *heat-shock proteins*), la cisteína proteinasa *b* (*cpb*), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD, *glucose-6-phosphate dehydrogenase*) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH, *6-phosphogluconate dehydrogenase*) (Van der Auwera y Dujardin, 2015; Akhoundi y col., 2017). En relación a las proteínas Hsp, la más utilizada es la Hsp70 que juega un papel como chaperona en el plegamiento y transporte de proteínas (Hartl y Hayer-Hartl, 2002) y está presente entre 5-10 copias en el genoma de *Leishmania*. Esta proteína permite la identificación de las diferentes especies de manera precisa mediante PCR-RFLP (García y col., 2004; Fraga y col., 2010; Montalvo y col., 2010, 2012) o qPCR-HRM (Cardoso y col., 2015; Zampieri y col., 2016). Otra diana ampliamente utilizada para la identificación de *Leishmania* es el gen *cpb*, implicado en la interacción parásito-hospedador, que se encuentra en múltiples copias en el genoma del parásito, presentando variabilidad en la secuencia nucleotídica y en el número de copias (Mottram y col., 1997), por lo que es una diana muy útil para la identificación de las diferentes especies (Quispe-Tintaya y col., 2004; García y col., 2005; Hide y Bañuls, 2008). Por último, los genes codificantes para las proteínas G6PD y 6PGDH son utilizados en técnicas de PCR convencional y a tiempo real, pero sobre todo en técnicas de tipificación de secuencias multilocus (MLST, *multilocus sequence typing*), junto con otros genes, en las que se analiza la variabilidad en la secuencia nucleotídica de un cuadro de genes. Esta técnica se considera una versión actualizada del MLEE (Castilho y col., 2003, 2008; De Andrade y col., 2006; Mauricio y col., 2006; Zemanová y col., 2007; Boité y col., 2012; Marco y col., 2015; Herrera y col., 2017).

En cuanto a las dianas de ADN extracromosómico, se centran fundamentalmente en el kinetoplasto, el cual está formado por numerosas secuencias de ADN circular agrupado en minicírculos y maxicírculos. Los primeros se encuentran en varios miles de copias y tienen un tamaño aproximado de 800 pb que se dividen en una región conservada (120 pb) y una región variable (Figura 8). Estos minicírculos codifican un ácido ribonucleico (ARN) guía, necesario para la edición de los transcritos codificados por los maxicírculos, los cuales están presentes en menor número (20-50 copias) y presentan un tamaño de alrededor de 23 kilobases (Kb) (Sturm y Simpson, 1991; Lukes y col., 2002). Se han desarrollado un gran número de técnicas basadas en el análisis de minicírculos siguiendo diferentes estrategias, como la discriminación por tamaño de secuencia (Noyes y col., 1998; Anders y col., 2002), PCRs específicas (Rocha y col., 2010; Weirather y col., 2011), PCR-RFLP (Degraeve y col., 1994; Noyes y col., 1998; Volpini y col., 2004; Ribolla y col., 2016; Souza-Castro y col., 2018), análisis de curvas de *melting* mediante HRM (Nicolas y col., 2002; Pita-Pereira y col., 2012; Ceccarelli y col., 2014), secuenciación (Kassahun y col., 2015) y también secuenciación de alto rendimiento (Kocher y col., 2017). Sin embargo, varios autores han observado problemas de reacción cruzada entre diferentes

especies de *Leishmania* debido a la elevada variabilidad presente en los minicírculos (Weirather y col., 2011; van der Auwera y Dujardin, 2015; Losada-Barragán y col., 2016; Ceccarelli y col., 2017).

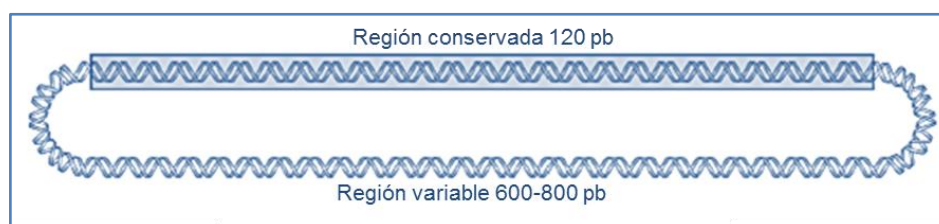


Figura 8. Esquema de la configuración del minicírculo del kinetoplasto. Fuente: modificado de Van der Auwera y Dujardin, 2015.

Por otro lado, en los maxicírculos se encuentran varias regiones de importancia como los genes del citocromo oxidasa (CO) y del citocromo *b* (*cytb*), implicados en la respiración celular. El gen CO no es muy utilizado para el genotipado de *Leishmania*, salvo algún estudio filogenético basado en el COII (Ibrahim y Barker, 2001; Cao y col., 2011). En el caso del *cytb*, sí se han realizado diversos ensayos que han discriminado entre la mayoría de especies de *Leishmania* con buena resolución y sensibilidad (Luyo-Acero y col., 2004; Foulet y col., 2007; Asato y col., 2009).

Otra técnica molecular utilizada es el genotipado de multilocus microsatélite (MLMT, *multilocus microsatellite typing*), en la que se amplifican y analizan las variaciones de un conjunto de regiones microsatélite (fragmentos de 1-6 pb repetidos en tándem y alta capacidad de mutación) del genoma del parásito, que dan lugar a un patrón de tamaño específico denominado huella genética que se utiliza principalmente para el genotipado y estudio de poblaciones (Kuhls y col., 2011; Schönian y col., 2011).

Recientemente se han desarrollado técnicas de espectrometría de masas, como la técnica de desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF, *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*), que parecen identificar de manera rápida y eficaz las diferentes especies de *Leishmania* basándose en las diferencias de los perfiles proteicos de las especies mediante el uso de patrones control (Cassagne y col., 2014; Mouri y col., 2014; Lachaud y col., 2017; Evers y col., 2018).

1.1.4. Cambios globales. Emergencia y/o reemergencia de enfermedades transmitidas por vectores

Las modificaciones en el medio ambiente y las alteraciones ecológicas causadas tanto por fenómenos naturales como por la acción del hombre pueden conducir a la emergencia o reemergencia de enfermedades, entre las que destacan las VBD. Cualquier cambio puede alterar el equilibrio existente en la relación entre microorganismos patógenos, vectores y hospedadores, caracterizada por una diversidad, abundancia, comportamiento y competencia vectorial concretos que se ven afectados al alterarse el

entorno y sus condiciones (Patz y col., 2000; Sutherst, 2004; Lambin y col., 2010; Colwell y col., 2011; Maroli y col., 2013; Bardosh y col., 2017; Cable y col., 2017) (Figura 9). Predecir la influencia y las consecuencias de este tipo de cambios producidos por una acción antropogénica es una tarea complicada ya que el medio natural actúa intentando contrarrestarlos (Sutherst, 2004). Además, todos estos factores varían de una región a otra, por lo que se deben analizar a nivel regional (Githeko y col., 2000).

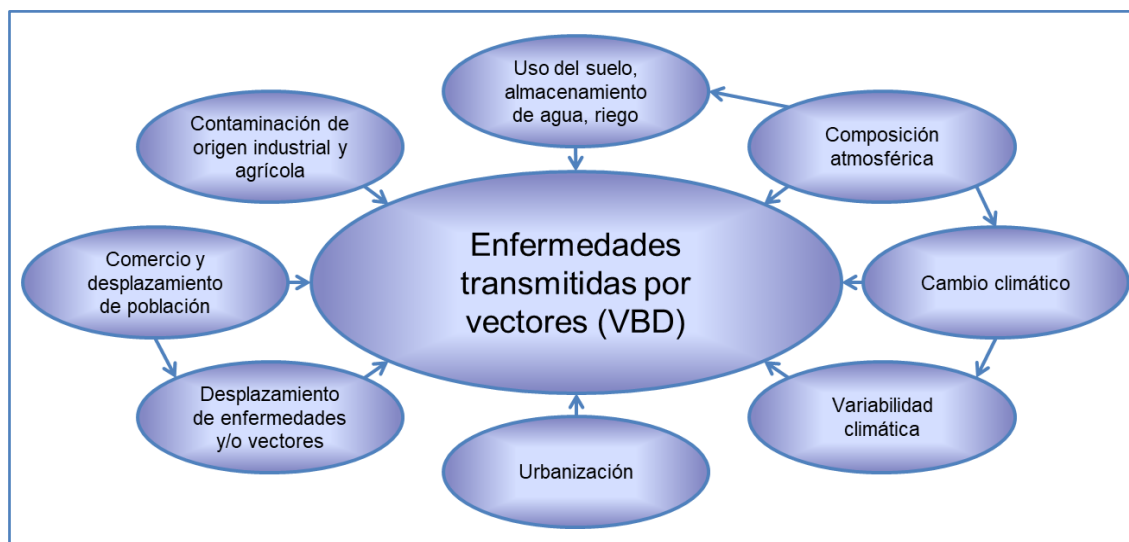


Figura 9. Factores impulsores del cambio global en relación con los potenciales cambios en la situación de las VBD. Fuente: modificado de Sutherst, 2004.

Los cambios globales pueden ir ligados a fenómenos naturales como terremotos, incendios, inundaciones, o asociados a la acción del hombre, como cambios en el uso del suelo, cambios socioeconómicos, movimientos poblacionales o el cambio climático (Lambin y col., 2010; Cable y col., 2017). Los cambios socioeconómicos van unidos a la aparición de nuevos asentamientos, explotación de tierras, y estos a la deforestación o reforestación de territorios, produciendo modificaciones en las poblaciones de vectores y su desplazamiento a nuevas zonas (Hay y col., 2006; Chaves y col., 2008; Kilpatrick y Randolph, 2012). La deforestación es una de las acciones antropogénicas con mayor impacto, pues se crean nuevas superficies que propician el contacto entre vectores, reservorios silvestres y humanos (Bardosh y col., 2017). Estas alteraciones en el uso del suelo, pueden llevar a una modificación de las redes tróficas existentes en el área, en las que se produce la interacción de nuevas especies, apareciendo potenciales vectores y hospedadores capaces de favorecer la transmisión de enfermedades (Cable y col., 2017). La explotación agrícola de territorios usualmente causa la reducción del número de vectores debido al uso de plaguicidas, y de la biodiversidad de hospedadores, lo que podría considerarse beneficioso. Sin embargo, también puede obligar al desplazamiento de los vectores a nuevas zonas en busca de fuentes de alimentación, pudiendo aproximarse a los asentamientos humanos, lo que aumentaría la exposición de estos a las VBD (Anderson y col., 2015; Bardosh y col., 2017). En cuanto a la urbanización de nuevos territorios, incrementa la posibilidad de que la población se asiente próxima al ciclo silvestre de una enfermedad, por lo que la exposición de animales domésticos y de

personas al patógeno se incrementaría, conduciendo a la aparición de brotes (Gubler, 1998; Rosário y col., 2016).

En relación al cambio climático, producido en gran medida por la emisión de gases de efecto invernadero a partir de actividades de origen humano, propicia la modificación de variables climáticas como la temperatura, la humedad y las tasas de precipitación, variables que afectan a la supervivencia, a la actividad y a la biología de los artrópodos vectores de patógenos (López-Vélez y Moreno, 2005; Gage y col., 2008; Iriso-Calle y col., 2017). Se han descrito 3 principales riesgos asociados al cambio climático y a las VBD (Ogden y Lindsay, 2016):

- Aparición de epidemias más virulentas, con mayor persistencia y duración, debido al aumento de la temperatura y a las variaciones en la estacionalidad de las precipitaciones.
- La dispersión de las VBD a zonas de mayor altitud y latitud debido al aumento de la temperatura, que favorece la propagación de los vectores.
- Aumento del riesgo de establecimiento de VBD endémicas de zonas tropicales y subtropicales en zonas no endémicas con condiciones climáticas idóneas en las que puede aumentar la densidad de vectores.

Generalmente, un aumento de la temperatura produce un incremento en la velocidad de desarrollo de los vectores, disminuyendo la duración de su ciclo biológico (Medlock y Leach, 2015; Parham y col., 2015; Ogden y Lindsay, 2016; Ogden, 2017). Además se pueden producir alteraciones en su estacionalidad y en la dinámica de las comunidades que afectan a la relación parásito/vector/hospedador, produciendo cambios en la adaptación y la aparición de nuevas cepas más competentes (Daszak y col., 2001; Gortázar y col., 2014; Negev y col., 2015).

El aumento del desplazamiento de personas, así como de mercancías y animales promueve la propagación de patógenos y de potenciales reservorios a nuevas regiones (Colwell y col., 2011). En el caso concreto de Europa, se ha registrado la transmisión autóctona de dengue y chikungunya debido a la presencia del vector *Aedes albopictus* y a la introducción de estos virus posiblemente a través de viajeros procedentes de regiones endémicas (Angelini y col., 2007; Grandadam y col., 2011; Succo y col., 2016; Manica y col., 2017). Por otro lado, el desplazamiento de población debido a conflictos armados o crisis humanitarias provoca que un gran número de personas se exponga a nuevos patógenos, tanto en aquellas desplazadas a las nuevas regiones, como los habitantes de las zonas de acogida. De esta manera, ambas poblaciones se verían expuestas a nuevos patógenos frente a los que su organismo no presenta inmunidad, aumentando el riesgo de aparición de brotes y epidemias (Beyrer y col., 2007; Aagaard-Hansen y col., 2010).

1.1.4.1. Cambios globales y leishmaniosis

En relación con la leishmaniosis, diversos estudios han analizado cómo los cambios globales pueden afectar a la transmisión de esta enfermedad, cuya infección en humanos depende en gran medida de la relación entre la actividad humana y el reservorio, en la que cualquier cambio ambiental puede conllevar una modificación de la distribución del parásito (Ashford, 2000; Shaw, 2007). Ready, 2008 describe tres maneras en la que el cambio climático puede afectar a la distribución de la leishmaniosis:

- Acción directa de la temperatura sobre el desarrollo y competencia de los flebotomos.
- Efecto indirecto de la temperatura y otras variables climáticas que puedan producir un aumento en la densidad de flebotomos.
- Acción indirecta a través de cambios socioeconómicos que incrementen el contacto del humano con los vectores.

En Europa, se han descrito tres escenarios en los cuales la leishmaniosis podría ampliar su distribución a regiones donde no está presente a causa de acciones antropogénicas (Ready, 2010). Estos escenarios recogen la introducción de nuevas especies o cepas de *Leishmania* debido al desplazamiento de personas y también de animales domésticos (Desjeux, 2001; Trotz-William y Trees, 2003), la dispersión de las especies ya presentes a nuevas regiones donde ya existe el vector competente pero no el parásito (Maroli y col., 2008; Ready, 2008), y la reemergencia del parásito debido al aumento de población inmunodeprimida, bien por otras patologías bien por tratamientos. La posible dispersión de los flebotomos, y probable aparición de la leishmaniosis en regiones del centro y del norte de Europa ha sido estudiada mediante modelos, que confirman esta tendencia gracias a un clima cada vez más favorable, pero también apuntan a la existencia de factores que limitarían esta dispersión como la orografía, el uso del suelo o las infraestructuras existentes (Fischer y col., 2011; Trajer y col., 2013).

Se han descrito numerosos casos donde las acciones antropogénicas parecen haber conducido a un incremento en la incidencia de la leishmaniosis en diversas regiones. Los cambios de uso de suelo, unidos a la deforestación, urbanización y migración de población se han relacionado con el aumento de la leishmaniosis en Latinoamérica, principalmente en Brasil (Nascimento y col., 2008). Se puede hablar de una urbanización de la leishmaniosis debida tanto a los movimientos poblacionales desde zonas rurales a ciudades como a la ampliación de urbes y a la construcción de nuevos asentamientos que favorecen la introducción del parásito en las ciudades y el contacto de la población con ciclos silvestres, además de contribuir a la modificación de la ecología del vector (Alirol y col., 2011). Por ello, la urbanización es considerado uno de los mayores riesgos en el aumento de la incidencia y dispersión de la leishmaniosis (OMS, 2002). Kassem y col., 2012 describen como los cambios en el entorno de un foco de LV en Egipto a causa de la urbanización, donde las condiciones de las viviendas fueron mejoradas y se eliminaron perros abandonados de las calles, dieron lugar a una disminución drástica del

número de flebotomos en la zona. Sin embargo, otros estudios en zonas urbanizadas reportan cómo, tras una aparente disminución de la densidad de estos dípteros, ésta vuelve a incrementarse, llegando a superar los valores anteriores al proceso de urbanización (Kamhawi y col., 1991; Boussaa y col., 2007). Por otro lado, en Kabul se registró un aumento de los casos de LC debido al desplazamiento de población desde el ámbito rural hacia zonas urbanas (Reyburn y col., 2003). El desplazamiento de la leishmaniosis a zonas periurbanas, e incluso urbanas, se ha dado también en Irán (Oshaghi y col., 2010), Italia (Tarallo y col., 2010), Marruecos (Boussaa y col., 2005) y México (Sánchez-García y col., 2010).

En el noreste de África los movimientos estacionales de población y ganado, el desplazamiento de refugiados a causa de conflictos armados y la malnutrición constituyen los mayores riesgos en la transmisión de la leishmaniosis. También en regiones de India, Bangladesh y Nepal se ha recogido un aumento en la incidencia de este parásito debido, principalmente, a la migración de población desde zonas rurales a urbanas (Desjeux, 2001). Una gran parte de los movimientos poblacionales son debidos a la búsqueda de condiciones de vida mejores, pero también a causa de los conflictos armados, como ha ocurrido en Afganistán y Pakistán, donde en la última década del siglo pasado se reportaron epidemias de LC causada por *L. tropica*, principalmente en campos de refugiados (Ashford y col., 1992; Rowland y col., 1999; Brooker y col., 2004). Más recientemente, la crisis en Siria debida a la guerra ha provocado que millones de personas se hayan visto obligadas a desplazarse a otros países. En el propio país, endémico para LC, el conflicto ha provocado grandes cambios que han dado lugar a brotes de la enfermedad tras años de control (Stamm, 2015; Du y col., 2016). Por otro lado, en los países de acogida como Jordania, Líbano o Turquía, se ha registrado un aumento de casos (Alawieh y col., 2014; Sharara y Kanj, 2014; Hayani y col., 2015; Özkeklikçi y col., 2017; Hajj y col., 2018). También en relación a los conflictos armados, es importante el riesgo de transmisión al personal militar, como se ha comprobado tras la guerra del Golfo (Magill y col., 1994; CDC, 1992), las guerras de Iraq y Afganistán (CDC, 2004a, 2004b) y en soldados retornados de la actual crisis en Siria (Obwaller y col., 2018).

1.2. Los flebotomos

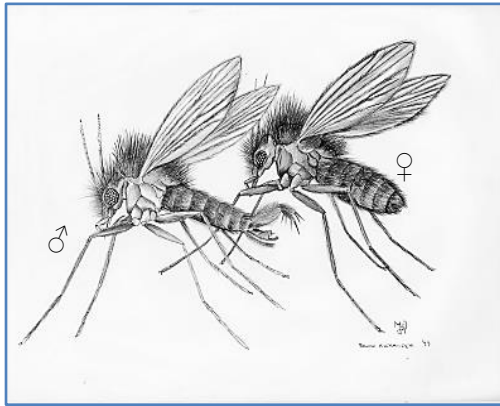
Los flebotomos son insectos hematófagos cuya importancia médica radica en ser vectores de diversos patógenos como parásitos (*Leishmania* sp.), bacterias (*Bartonella* sp.) o virus del género *Phlebovirus* (Familia Bunyaviridae) y *Vesiculovirus* (Familia Rhabdoviridae) (Depaquit y col., 2010; Maroli y col., 2013). Están descritas más de 800 especies de flebotomos, repartidas entre el Viejo Mundo y el Nuevo Mundo. La mayoría de especies descritas en el Viejo Mundo se distribuyen por zonas desérticas y semiáridas, aunque algunas especies se encuentran en regiones peridomésticas y entran en contacto con poblaciones humanas (Akhoundi y col., 2016). Por otro lado, las especies

Introducción

del Nuevo Mundo se encuentran cercanas a zonas selváticas, aunque los movimientos migratorios hacia zonas urbanas han modificado este patrón, encontrándose actualmente también en áreas periurbanas y urbanas (Sharma y Singh, 2008; Harhay y col., 2011).

1.2.1. Identificación

Los flebotomos son dípteros de pequeño tamaño, no superan los 3-4 mm, que se caracterizan por poseer un cuerpo de color variable desde tonos blanquecinos a



prácticamente negro y cubierto por abundante pilosidad, antenas largas, alas pilosas formando un ángulo de 45° en reposo y presencia de una gibosidad debida al ángulo formado por la cabeza y el tórax (Killick-Kendrick, 1999) (Figura 10).

Figura 10. Hembra y macho de flebotomo. Fuente: modificado de Bruce Alexandre (<https://roddillon.com/dillions-sand-fly-research/>).

Las hembras presentan piezas bucales largas adaptadas para la ingesta de sangre, con mandíbulas y palpos maxilares formados por cinco segmentos. La identificación de las hembras se basa principalmente en el aspecto de la faringe (lisa, estriada o espinosa), en la armadura cibarial (número y aspecto de los dientes horizontales y verticales), en el arco cibarial (Figura 11), en la forma de la espermatecas (anilladas, imbricadas, en saco, lisas) y en el aspecto y longitud de los conductos espermáticos (Figura 12) (Feliciangeli, 2006).

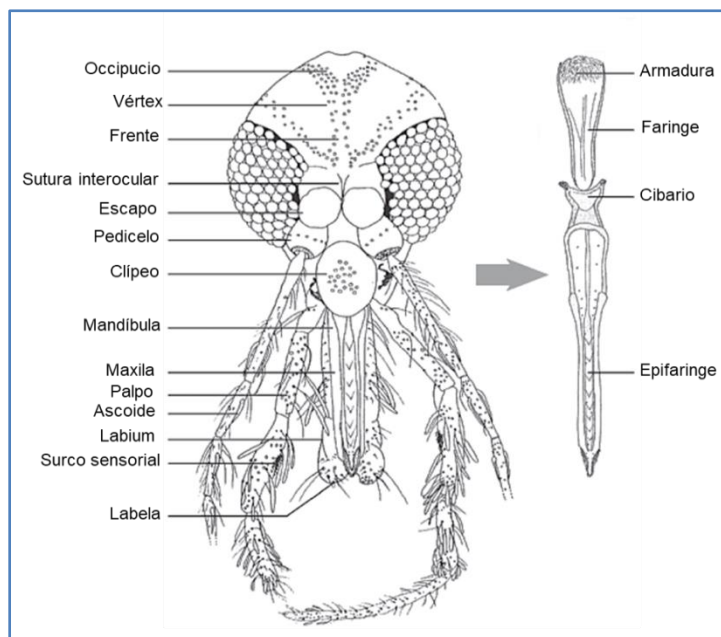


Figura 11. Morfología de la cabeza y de las piezas bucales de un flebotomo. Fuente: modificado de Jobling y col., 1987; Léger y Depaquit, 1999.

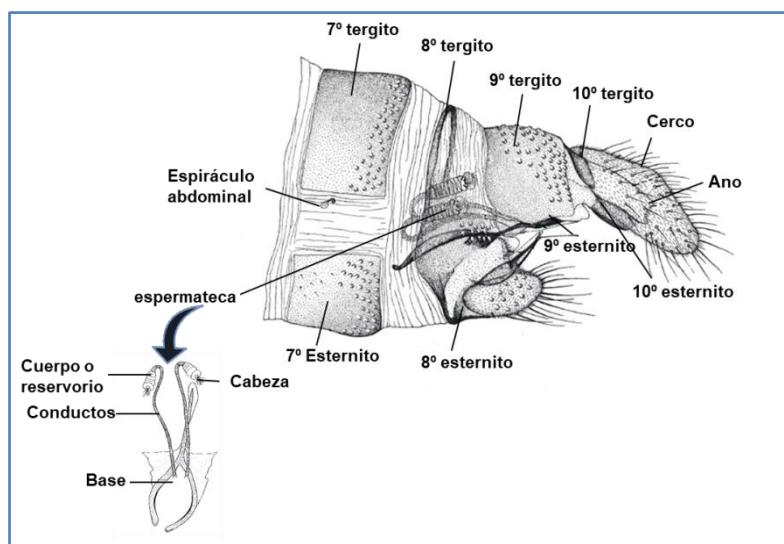


Figura 12. Segmentos finales del abdomen de una hembra de flebotomo. Fuente: modificado de Léger y Depaquit, 1999.

En el caso de los machos, la forma y apéndices de la genitalia constituyen los principales caracteres identificativos. Para su identificación se examina el número de espinas en el estilo, la forma del parámero, la presencia o no de mechones en el coxito, la presencia de setas modificadas en el lóbulo lateral, y la longitud y aspecto de los filamentos genitales (Figura 13) (Feliciangeli, 2006).

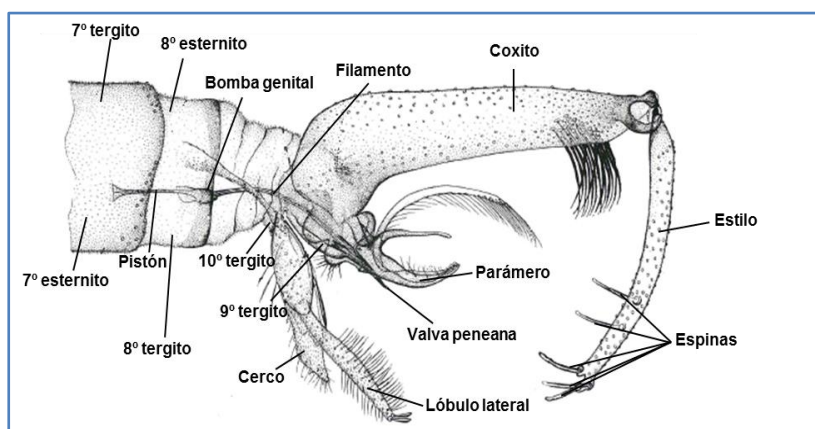


Figura 13. Segmentos finales del abdomen de un macho de flebotomo. Fuente: modificado de Jobling y col., 1987.

Además de los caracteres anteriormente mencionados, existen otras características morfológicas que aportan información taxonómica como la localización e intensidad de la pigmentación del tórax, la morfometría de las venaciones de las alas y la segmentación de las antenas y de las patas (Young y Duncan, 1994).

La identificación y clasificación de los flebotomos se ha realizado tradicionalmente basándose en estos caracteres morfológicos mencionados. Sin embargo, con el avance de la biología molecular se ha desarrollado un gran número de técnicas que permiten la caracterización de los flebotomos a partir del análisis de ADN, como fueron en su comienzo las técnicas *dot-blotting* y *Southern-Blot*. Actualmente, gran parte de la metodología se basa en la amplificación y secuenciación de dianas génicas como los genes mitocondriales *cytb* y *COI* o los genes nucleares ribosomales (28S e ITS2) (Ready, 2013; Depaquit, 2014), aunque existen otras técnicas como el genotipado por

microsatélites, utilizado principalmente en el estudio de poblaciones (Aransay y col., 2003; Hamarsheh y Amro, 2011; Hamarsheh y col., 2018). Además, la mayor eficiencia, disponibilidad y abaratamiento de técnicas de secuenciación de nueva generación hace que puedan utilizarse para la identificación a gran escala de flebotomos en estudios entomológicos (Neal y col., 2016; Casaril y col., 2017). Por otro lado, también existen técnicas basadas en el análisis de perfiles proteicos como la técnica MALDI-TOF, que pueden ser una alternativa a las técnicas de análisis de ADN y que se presentan como métodos sencillos, rápidos y de bajo coste (Dvorak y col., 2014; Mathis y col., 2015; Lafri y col., 2016; Yssouf y col., 2016; Halada y col., 2018).

1.2.2. Taxonomía

Taxonómicamente, los flebotomos se ubican en el filo Arthropoda, clase Insecta, orden Diptera, suborden Nematocera, familia Psychodidae y subfamilia Phlebotominae. (Feliciangeli, 2006). Los miembros de esta subfamilia se caracterizan por poseer piezas bucales más largas que la cabeza, palpos divididos en cinco segmentos, mandíbulas desarrolladas, antenas casi cilíndricas y vena radial del ala distribuida en cinco ramas (OPS, 2009).

Se diferencian dos periodos en la historia de la taxonomía de los flebotomos. En el primero, la distinción de los taxones se llevó a cabo principalmente observando las características morfológicas de las estructuras externas, como la forma de la genitalia externa de los machos o las venaciones de las alas. En el segundo periodo, la diferenciación entre flebotomos se centró en la descripción en caracteres internos, tales como la espermateca de las hembras, el cibario o la faringe (Adler y Theodor, 1926).

En 1691 se llevó a cabo la primera descripción de un flebotomo (Bonanni, 1691), al que se denominó *Culex minutus*. Fue casi cien años más tarde, en 1786, cuando Scopoli describió *Bibio papatasi*. En relación con el género *Phlebotomus*, fue inicialmente nombrado por Rondani en 1843 como Flebotomus, que etimológicamente significa “que corta las venas”. Este término fue posteriormente corregido a su forma latina por Agassiz en 1848.

La primera clasificación de flebotomos, propuesta por Lewis y col., 1977, se basa en las observaciones de estudios anteriores (Theodor, 1948, 1965), y subdivide los flebotomos del Viejo Mundo en dos géneros, *Phlebotomus* (Rondani) y *Sergentomyia* (França), y los flebotomos del Nuevo Mundo en tres géneros, *Lutzomyia* (França), *Brumptomyia* (França y Parrot) y *Warileya* (Hertig). Posteriormente, se incluyó el género *Chinius* (Leng, 1987) entre los flebotomos del Viejo Mundo. Sin embargo, la continua descripción de nuevas especies y la gran cantidad de información que las técnicas moleculares permiten obtener, conducen a una constante actualización como consecuencia de la dificultad en la reconstrucción de la historia evolutiva de estos insectos (Ready, 2013). Es por estas dificultades para consensuar una clasificación global de los flebotomos por lo que la comunidad científica ha acordado la siguiente clasificación de la familia Phlebotominae:

tres géneros entre los flebotomos del Viejo Mundo (*Phlebotomus*, 13 subgéneros; *Sergentomyia*, 10 subgéneros; y *Chinius*, 4 especies) y otros tres entre los flebotomos del Nuevo Mundo (*Lutzomyia*, 26 subgéneros; *Brumptomyia*, 24 especies; y *Warileya*, 6 especies) (Lane, 1993; Young y Duncan, 1994; Akhouni y col., 2016) (Figura 14).

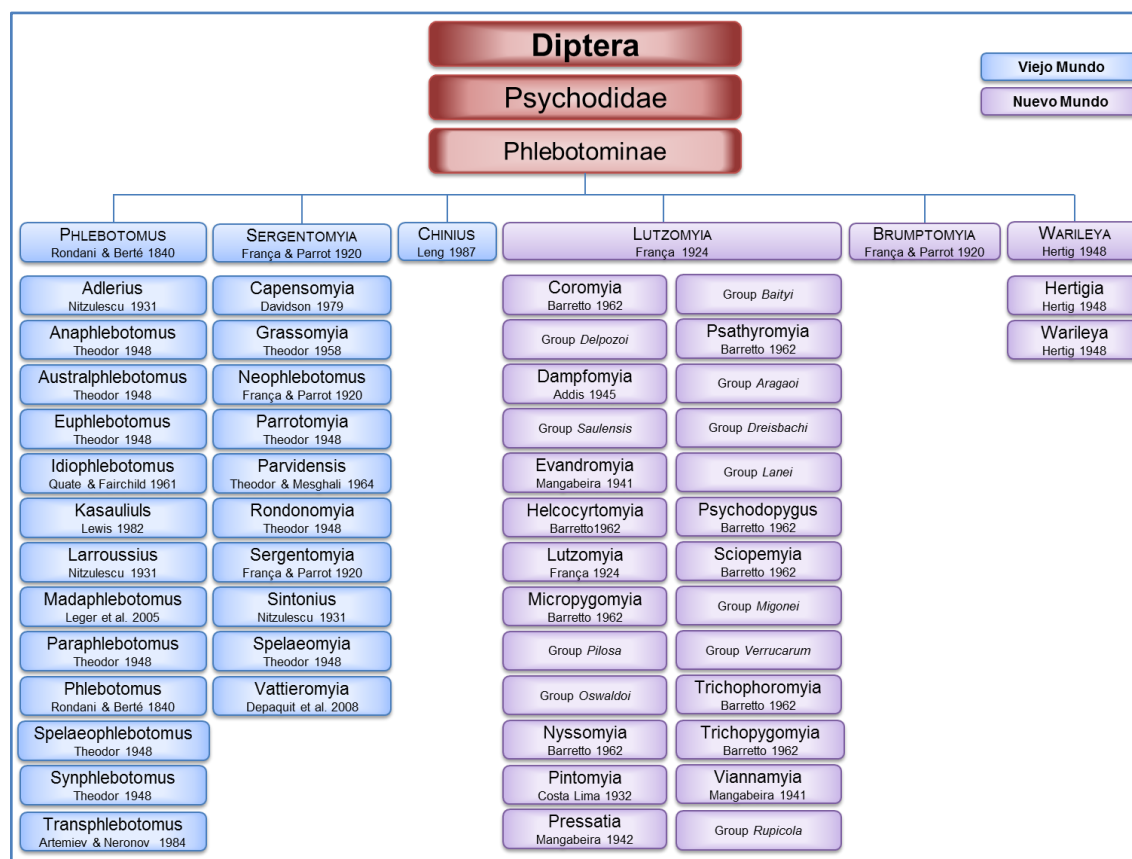


Figura 14. Clasificación de las especies de flebotomos del Viejo y Nuevo Mundo. Fuente: modificado de Akhouni y col., 2016.

Centrándonos en los flebotomos del Viejo mundo, se pueden encontrar en las regiones Paleoártica, Afrotropical, Oriental, Australiana y en Madagascar, y se subdividen en 13 subgéneros: *Adlerius*, *Anaphlebotomus*, *Australphlebotomus*, *Euphlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Kasauliuls*, *Larroussius*, *Madaphlebotomus*, *Paraphlebotomus*, *Phlebotomus*, *Spelaeophlebotomus*, *Synphlebotomus* y *Transphlebotomus*. Todos los vectores de LC y LV en Eurasia y África pertenecen al subgénero *Phlebotomus*, que se extiende por el Mediterráneo, región Afrotropical, Oriente Medio y regiones orientales y centrales de Asia. En el caso del género *Sergentomyia* (Frañça), se subdivide en 10 subgéneros: *Capensomyia*, *Grassomyia*, *Neophlebotomus*, *Parrotomyia*, *Parvidens*, *Rondonomyia*, *Sergentomyia*, *Sintonius*, *Spelaeomyia* y *Vattieromyia*. Están ampliamente distribuidos por el Viejo Mundo, siendo predominantes en aquellas zonas tropicales donde existen pocas especies del género *Phlebotomus* (Akhouni y col., 2016). Los flebotomos pertenecientes al género *Sergentomyia* son vectores de *Sauroleishmania* y tripanosomas parásitos de reptiles (Lewis, 1974), pero algunos estudios han identificado otras especies de *Leishmania* en estos flebotomos, algunas de ellas patógenas de humanos, lo que podría involucrarlos en la transmisión de parásitos que afectan a

humanos (Mutinga y col., 1994; Mukherjee y col., 1997; Campino y col., 2013; Kanjanopas y col., 2013; Chusri y col., 2014; Nzelu y col., 2014; Ayari y col., 2016; Bravo-Barriga y col., 2016b; Jaouadi y col., 2015; Maia y Depaquit, 2016; Latrofa y col., 2018; Siripattanapipong y col., 2018). Por último, el género *Chinius* (Leng) incluye 4 especies: *Chinius junlianensis*, *Chinius barbazani*, *Chinius eunicegalatae* y *Chinius samarensis* (Figura 15).

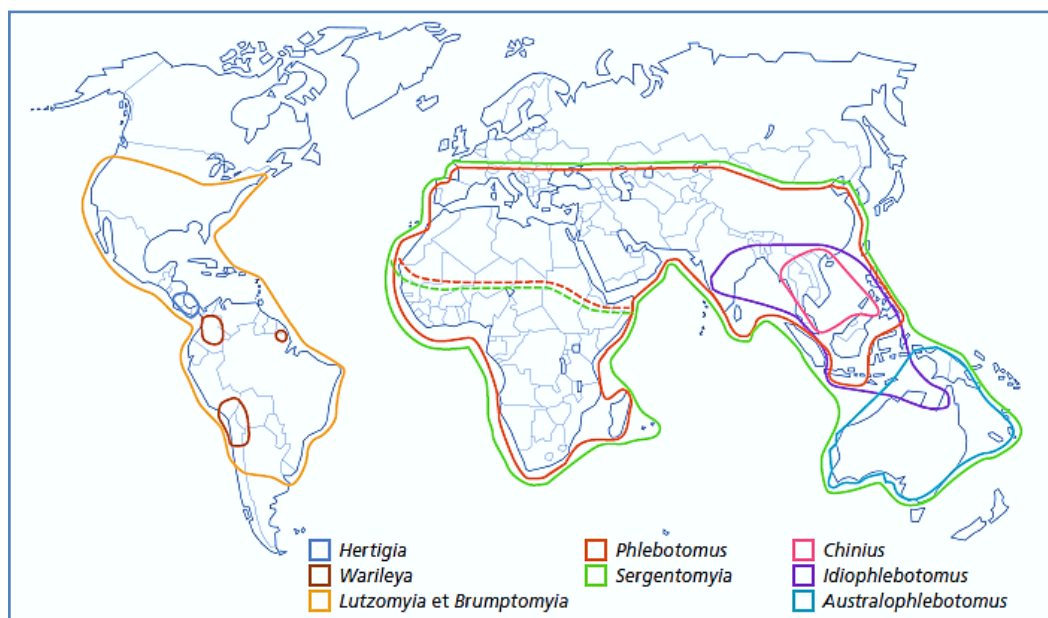


Figura 15. Distribución de los principales géneros de flebotomos. La distribución del género *Lutzomyia* se ha considerado según Young y Duncan, 1994. Fuente: modificado de Léger y Depaquit, 1999.

1.2.3. Métodos de muestreo de flebotomos

El estudio de la relación flebotomo-parásito, los estudios de comportamiento del vector, de su taxonomía o de su ecología requieren la captura de ejemplares de flebotomos. Para ello se debe tener en consideración la biología del díptero, como los hábitos nocturnos y sitios de reposo. Existen diferentes clases de técnicas para capturar flebotomos, que se pueden dividir en dos grandes grupos: trampas de interceptación y trampas de atracción. Con las primeras se capturan ejemplares sin utilizar ninguna clase de atrayente, que quedan atrapados al pasar por donde se ha colocado la trampa, por lo que normalmente la cantidad de flebotomos capturados es menor, a excepción de aquellos lugares donde su densidad sea excepcionalmente alta. En cuanto a las trampas de atracción, se utilizan diferentes elementos para atraer a los flebotomos, como la luz, el dióxido de carbono (CO₂), olores, animales, etc. Las diferentes técnicas de captura han sido ampliamente revisadas por Alexander, 2000 y Alten y col., 2015.

A continuación se expone un resumen de los métodos para la captura de flebotomos adultos:

- Con capturador: este método permite atrapar ejemplares vivos que se encuentran posados sobre animales, refugios de animales o muros de viviendas. Se puede llevar a cabo tanto con capturadores bucales “manuales” como automáticos en los que se añade un motor que produce la fuerza de succión. Entre las ventajas de este método destacan la posibilidad de encontrar los lugares de reposo y la de estimar cambios en la densidad de población. Sin embargo, se trata de una técnica laboriosa, difícil de estandarizar y en la que los flebotomos pueden resultar dañados.
- Sobre “cebo humano”: supone la captura de ejemplares posados sobre personas, lo que permite capturar flebotomos con comportamiento antropofílico. Los flebotomos deben ser capturados antes de que se alimenten, para evitar que puedan transmitir la leishmaniosis u otras enfermedades. Por razones éticas este tipo de capturas está en desuso. Otra desventaja es la variabilidad en la atracción que cada persona ejerce hacia el vector.
- Trampas con animales como cebo (*Disney*): en este tipo de trampas se colocan animales dentro de una jaula, en la que quedan atrapados los flebotomos que se han visto atraídos por esa fuente de alimentación. Permite capturar ejemplares vivos, además de evaluar el poder de atracción de los animales utilizados como cebo. Presenta como desventajas su laboriosidad, así como la limitación del número de trampas que se pueden utilizar.
- Trampas de luz: utilizan como atrayente una fuente de luz. Permite capturar los flebotomos vivos, aunque puede ocurrir que los ejemplares se vean dañados y mueran; y además es una técnica que permite la estandarización de su uso (Figura 16). Las primeras trampas de luz se desarrollaron en 1932 (*New Jersey Light Traps*) en las cuales los flebotomos capturados eran conducidos a recipientes con productos tóxicos. En el caso de que sea preciso mantener con vida los flebotomos, la fuente de luz se acopla a una jaula en la que quedan retenidos. El tipo de trampas de luz más utilizadas actualmente son las *CDC Light Traps*, cuyo primer diseño data de 1962 (Sudia y Chamberlain, 1962), que ha ido modificándose con posterioridad. Las trampas se deben colocar antes de la caída del sol y recoger al amanecer. Además, se recomienda su colocación a 1,5-2 m de altura y en lugares alejados de fuentes de luz artificial, para una mejor eficiencia. Dentro de las desventajas de este tipo de trampas están que el rango de actuación es limitado y que no todas las especies de flebotomos son fototrópicas. En cuanto a la fuente de luz, tradicionalmente se han utilizado bombillas de luz incandescente blanca, pero se han realizado estudios con luces de diferentes longitudes de onda, como luz ultravioleta (UV) y diodos emisores de luz (LED, *Ligh-emitting diode*), que han demostrado que se puede mejorar la eficiencia de estas trampas (Hoel y col., 2007; Cohnstaedt y col., 2008; Silva y col., 2015;

Gaglio y col., 2017). Por otro lado, se puede aumentar el número de ejemplares capturados si se combina la atracción por la luz con una fuente de CO₂.



Figura 16. Trampa de luz tipo CDC. Fuente: Laboratorio de Entomología Médica (Centro Nacional de Microbiología-Instituto de Salud Carlos III) (LEM (CNM-ISCIII)).

- Trampas de vuelo: consisten en una estructura construida con nylon o tejido similar, que se coloca en zonas probables de paso de los flebotomos. Cuando los flebotomos entran por esa estructura son conducidos a recipientes que contienen productos químicos, como acetato de etilo o cianuro de potasio, causándoles la muerte. Precisamente esta es su mayor desventaja, junto con una abundante captura de ejemplares dañados.
- Trampas adhesivas: se trata de un método muy utilizado por su sencillez y bajo coste, aunque no está bien estandarizado. Consiste en piezas de papel impregnadas con un compuesto fuertemente denso, como el aceite de ricino. Estos papeles son colocados en zonas potenciales de paso o cerca de zonas de reposo, quedando los flebotomos adheridos gracias a viscosidad del aceite (Figura 17). Las capturas se expresan como el número de flebotomos capturados por superficie de muestreo. Las desventajas de este tipo de trampas es que sólo se capturan ejemplares muertos, los cuales pueden resultar dañados al ser despegados del papel, dificultando la posterior identificación taxonómica de la especie, además de la pérdida de material. Estas trampas no se pueden utilizar en



zonas con una humedad relativa alta ya que el aceite de ricino no es efectivo en tales condiciones.

Figura 17. Trampas adhesivas colocadas a lo largo de una zona de muestreo. Fuente: LEM (CNM-ISCIII).

Así mismo, se ha comprobado que el tipo de trampa usada puede afectar a los posteriores análisis a los que se sometan los ejemplares capturados. En este sentido, Halada y col., 2018 han comprobado que los resultados en el análisis por MALDI-TOF de flebotomos capturados mediante trampas adhesivas ofrecen peores resultados que los capturados mediante trampas de luz.

Para tratar de determinar los lugares de desarrollo larvario existen dos métodos: trampas de emergencia (Figura 18) y el examen de muestras de suelo. Las trampas de emergencia se colocan en potenciales lugares de reposo para comprobar si se capturan adultos recién emergidos. Esto se puede saber gracias a que los machos recién emergidos presentan la genitalia sin rotar a su posición definitiva. En el caso del examen de suelo, la técnica se basa en el método de flotación utilizando una solución saturada de azúcar (McCombie-Young y Brendish, 1926), en el cual la muestra de suelo se mezcla con agua y se desecha el sobrenadante. La otra parte se mezcla con una solución



saturada azucarada, en la cual las larvas de flebotomo flotan y se pueden recoger. Ambos tipos de trampas son muy laboriosos, lo que junto a la dificultad de reconocer los lugares de cría de los flebotomos, hace que este tipo de trampas sean poco utilizadas.

Figura 18. Trampa de emergencia para la captura de flebotomos adultos recién emergidos fijada al suelo en la que se dispone una fina tela que evite que los flebotomos escapen. Está protegida con una cubierta que la preserva de la acción del sol y la lluvia. Fuente: modificado de Casanova y col., 2013.

1.2.4. Control del vector

La finalidad última de un programa de control vectorial es la interrupción de la transmisión de una enfermedad desde el vector a la población susceptible. En el caso de las enfermedades transmitidas por flebotomos, para poder llevar a cabo el control de la población de estos dípteros en una región es imprescindible conocer de qué especies está compuesta esa población, cual o cuales pueden intervenir en la transmisión del patógeno, así como el comportamiento de las mismas, su grado de exofilia-endofilia, su relación con el ambiente, su estacionalidad, rango de vuelo, zonas de reposo, etc. También es importante conocer los reservorios potenciales presentes, si los flebotomos presentan preferencias alimentarias oportunistas o si tienen tendencia a alimentarse sobre un vertebrado en concreto, incluido el humano (Warburg y Faiman, 2011). Ya que las características entre diferentes regiones pueden ser muy variables, es necesario realizar estudios específicos en aquellas áreas afectadas, puesto que las medidas implementadas en una zona pueden no ser efectivas en otras. De esta manera, existen

distintos tipos de métodos que se pueden llevar a cabo como son el uso de productos químicos, medidas de tipo medioambiental o la utilización de medidas de protección personal. Lo recomendable es el uso combinado de estas metodologías, realizando una estrategia integrada del control del vector o vectores a partir de una planificación previa en la que se haya llevado a cabo una evaluación de la ecología de la región, un planteamiento de los objetivos y de los métodos para alcanzarlos, junto con un plan de seguimiento y evaluación con el fin de optimizar los recursos disponibles (Killick-Kendrick, 1990a; OMS, 2010; Ejov y Dagne, 2014).

El uso de productos químicos para el control de flebotomos engloba diferentes estrategias (Alexander y Maroli, 2003): aplicación de insecticidas de acción residual (Kelly y col., 1997; Kishore y col., 2006; Das y col., 2010), utilización de mallas tratadas con insecticidas (ITNs, *insecticide-treated nets*; LLINs, *long-lasting insecticidal nets*) (Majori y col., 1989; Alexander y col., 1995; Dinesh y col., 2008; Picado y col., 2010), uso de repelentes químicos, directamente sobre la piel o sobre la ropa de las personas (Schreck y col., 1982; Fossati y Maroli, 1986; Warburg y Faiman, 2011), sobre perros y gatos a través de collares impregnados con productos como la deltametrina o con productos de aplicación directa sobre la piel del animal mediante pipetas (Killick-Kendrick y col., 1997; Lucientes, 1999; Solano-Gallego y col., 2011; Brianti y col., 2017). Otra alternativa es la utilización de pesticidas orales como el ácido bórico junto con zumo de frutas, azúcar y agua conformando los denominados cebos de azúcar tóxico (ATSB, *attractive toxic sugar baits*) que se diseminan por plantas, vallas o muros (Müller y col., 2008; Müller y Schlein, 2011; Qualls y col., 2015; Saghafipour y col., 2017).

Por otro lado, la gestión medioambiental tiene como finalidad la reducción de poblaciones de flebotomos mediante intervenciones sobre los nichos ecológicos. Algunas medidas consisten en la destrucción de madrigueras y la eliminación de vegetación, escombreras o vertederos que puedan servir de zona de cría y reposo (Dhiman, 1995). También se contemplan medidas de control de los potenciales reservorios a través de la reducción de la población mediante su eliminación o destruyendo sus lugares de cría (Yaghoobi-Ershadi, 2016).

Por último, también existen medidas de control biológico, mucho menos utilizadas debido a la falta de información sobre su efectividad y a que están destinadas mayoritariamente a los estadios larvarios. Por ejemplo, se ha demostrado la efectividad de *Bacillus thurigiensis* y *Bacillus sphaericus* sobre las larvas de flebotomo en experimentos de laboratorio, pero la falta de información sobre las zonas de cría sobre el terreno dificultan su aplicación (Robert y col., 1998; Wermelinger y col., 2000).

1.2.5. Biología del flebotomo

1.2.5.1. Ciclo de vida

Los flebotomos se incluyen dentro de los insectos holometábolos ya que presentan metamorfosis completa. En concreto, el ciclo de vida de estos dípteros está constituido por la fase de huevo, 4 estadios larvares, la pupa y, finalmente, el adulto (Figura 19). Los huevos de los flebotomos presentan una forma elíptica con patrones de estrías y dibujos geométricos en el exocorion. La coloración es inicialmente blanquecina, para luego adquirir un tono oscuro entre marrón y negro. La larva emerge a los 7-10 días desde la ingestión de sangre, y su desarrollo hasta el estado de pupa se prolonga alrededor de 3 semanas (Killick-Kendrick, 1999). El tamaño de los estadios larvares varía desde los 0,55 mm de la larva L1 hasta 3,2 mm de la L4. El primer estadio normalmente presenta dos setas caudales, y a partir del segundo estadio se pueden distinguir 4 setas (Claborn, 2010). Unos días antes de la pupación, la larva de cuarto estadio se inmoviliza y fija al sustrato por los segmentos terminales, transformándose en una pupa sésil que dará lugar a la forma adulta en un periodo aproximado de 10 días, dependiendo de las condiciones ambientales. En general, emergen los machos antes que las hembras (Feliciangeli, 2006).

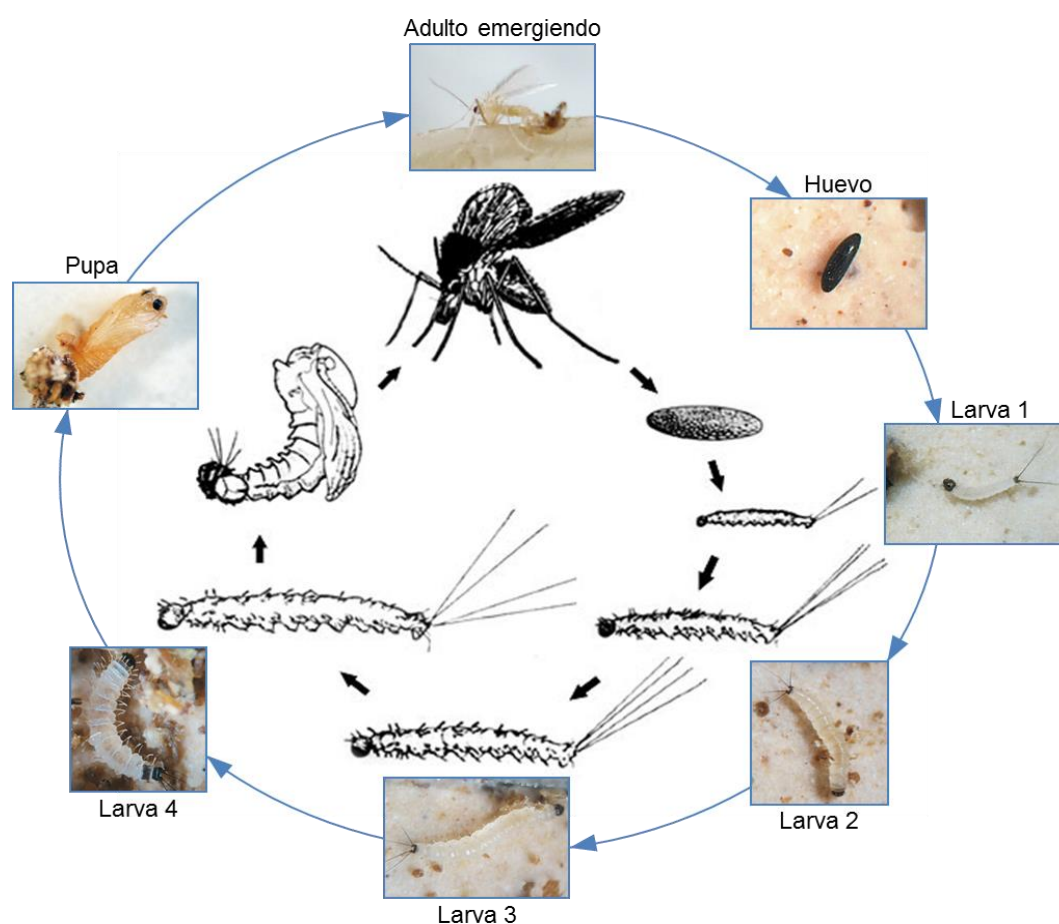


Figura 19. Ciclo de vida de los flebotomos. Fuente: modificado de Léger y Depaquit, 1999; LEM (CNM-ISCI); imagen central: página web de la Universidad de Liverpool (http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle_habitats.htm).

La duración del ciclo de vida de los flebotomos varía en las diferentes especies y en función de los factores ambientales, pero se estima que el promedio de tiempo desde la puesta hasta que emerge el adulto es de 1 mes y medio a 2 meses. Existen especies de flebotomos que sufren diapausa: en zonas paleoárticas el desarrollo se detiene en el cuarto estadio larvario, mientras que en aquellas especies de zonas más templadas y húmedas la diapausa se puede dar en la fase de huevo (Trouillet y Vattier-Bernard, 1979; Killick-Kendrick y Killick-Kendrick, 1987; Schlein y col., 1990).

1.2.5.2. Apareamiento y oviposición

El apareamiento de los flebotomos puede tener lugar antes, durante o después de la ingesta de sangre por parte de las hembras, dependiendo de la especie (Figura 20) (Killick-Kendrick, 1999). Algunas hembras poseen ciclos gonotróficos concordantes, es decir, los ovarios se desarrollan con una ingesta de sangre y no necesitan volver a tomar sangre hasta haber puesto los huevos (*P. perniciosus*, *Phlebotomus ariasi*, *Phlebotomus orientalis*); mientras que otras hembras presentan ciclos gonotróficos discordantes, en los que no hay relación entre la ingesta de sangre y el desarrollo de huevos y pueden realizar varias ingestas de sangre a lo largo de un mismo ciclo gonotrófico, como puede suceder en *Lutzomyia longipalpis* o *Phlebotomus argentipes* (OMS, 2010). Así mismo se han



descrito algunas especies que pueden ser autógenas, como *Phlebotomus papatasi* (El-Kammah, 1973) que puede poner huevos sin haberse alimentado de sangre, y una especie del Nuevo Mundo (*Lutzomyia mamedei*) que presenta tanto autogenia como partenogénesis (Oliveira y col., 1994).

Figura 20. Apareamiento de *P. perniciosus*.
Fuente: LEM (CNM-ISCIII).

La oviposición tiene lugar en ecosistemas terrestres, pero la información sobre los lugares de cría naturales de los flebotomos es escasa. Tan sólo se conoce que deben aportar la materia orgánica, calor y humedad necesarios para el correcto desarrollo de las larvas. Entre los posibles lugares se pueden encontrar una gran variedad de hábitats (domésticos, peridomésticos o silvestres), entre los que se han descrito madrigueras, mechinales, troncos de árboles viejos, edificios en ruinas, grietas de paredes, refugios de animales o restos de basura (Feliciangeli, 2004). Algunos estudios señalan que los sitios de puesta son escogidos por las hembras atraídas por ciertos componentes del sustrato e incluso por feromonas emitidas por huevos de la misma especie (Dougherty y col., 1994). En el caso de *P. argentipes* se ha visto que las hembras se ven atraídas por el olor de sustancias orgánicas remanentes de restos de ejemplares muertos, huevos no eclosionados y comida de las larvas que contiene restos de heces (Kumar y col., 2013).

1.2.5.3. Sitios de reposo

Los flebotomos son muy susceptibles a la falta de humedad, por lo que la mayoría de las especies son nocturnas o crepusculares. Por ello, deben buscar lugares de reposo con las condiciones adecuadas en los que pasar el tiempo que permanecen inactivos (Claborn, 2010). Los lugares de reposo más comunes suelen ser templados y húmedos como cuevas, grietas en paredes y suelos, vegetación densa, madrigueras de animales o termiteros. Aquellas especies que sean endofílicas se podrán encontrar en el interior de edificios (OMS, 2010). Sin embargo, estos hábitos dependen también de la presencia y abundancia de hospedadores y de la idoneidad de los inmuebles que haya en las inmediaciones (Lewis, 1974). Los sitios de reposo no siempre se diferencian de los lugares donde las hembras ponen los huevos y se desarrollan las larvas (Killick-Kendrick, 1999).

1.2.5.4. Rango de vuelo

Los flebotomos presentan un movimiento muy característico en el que se van desplazando a pequeños saltos. Son silenciosos y su rango de vuelo es relativamente corto, comparado con otros insectos como los culícidos (OMS, 2010). La velocidad de vuelo calculada mediante estudios en túnel de viento se estima en alrededor de 1 m/s (Killick-Kendrick y col., 1986). A pesar de que su rango de dispersión se supone muy limitado por estas características, mediante experimentos de captura-marcaje-recaptura se ha visto que *P. ariasi* llega a desplazarse hasta 2 km (Killick-Kendrick y col., 1984).

1.2.6. Alimentación

Tanto hembras como machos se alimentan de azúcares de plantas y de áfidos que almacenan en el divertículo esofágico. Estas sustancias además de servir como fuente de energía, parecen tener un papel importante en el desarrollo de los parásitos en el tubo digestivo de los flebotomos (Cameron y col., 1995; OMS, 2010). En un principio, una pequeña cantidad de los azúcares ingeridos pasa hacia el estómago a través de la válvula estomodeal (VE), la cual se cierra debido a la presencia de unos quimiorreceptores en la unión del esófago con la VE que reaccionan promoviendo su cierre (Figura 21). Mediante este mecanismo los azúcares son dirigidos al divertículo, donde se almacenan para luego ser trasvasados al estómago en pequeñas cantidades, dependiendo de los requerimientos energéticos del flebotomo (Tang y Ward, 1998). Ocasionalmente se ha descrito la presencia de sangre en el abdomen de los machos, pero se asume que ha sido ingerida de heridas abiertas puesto que el aparato bucal de los machos no está lo suficientemente desarrollado para la laceración de tejidos (Adler y Theodor, 1926).

Las hembras, además de ingerir azúcares, se alimentan de sangre, ya que salvo en algunas especies (apartado 1.2.5.2), es necesaria para el desarrollo de los huevos (OMS, 2010).

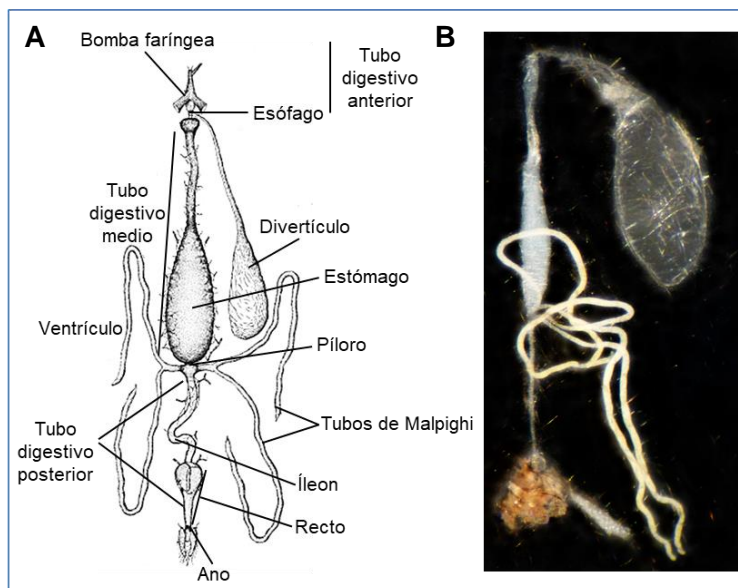
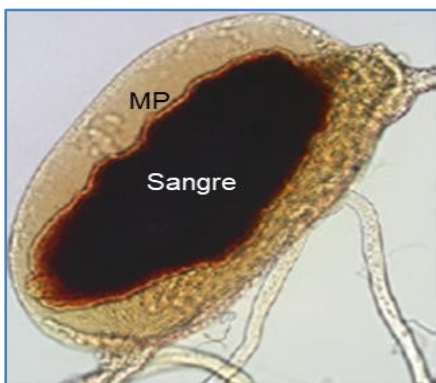


Figura 21. Representación (A) y fotografía (B) del tubo digestivo de un flebotomo. Fuente: esquema modificado de Jobling y col., 1987; fotografía, LEM (CNM, ISCIII).

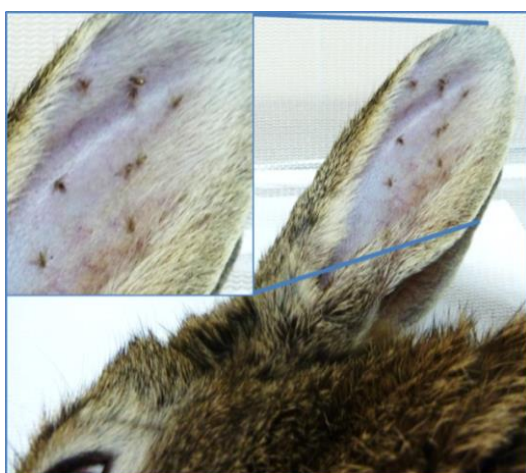
Los flebotomos son insectos telmófagos, es decir, para poder alimentarse de sangre las hembras laceran la piel del animal utilizando sus mandíbulas, provocando una pequeña acumulación de sangre de la cual se alimentan. Esta laceración es posible gracias a las estructuras que conforman el aparato bucal (mandíbulas, maxilas, labro y labio) (ver Figura 11), que actúan como una sierra, principalmente las maxilas al poseer un mayor rango de movimiento que el resto. La mandíbula, por otro lado, penetra y ensancha la herida. De esta manera, la sangre de los capilares escapa y puede ser ingerida a través de un sistema de bombeo por presión negativa, mediante rápidos movimientos y contracciones de los músculos del aparato bucal (Adler y Theodor, 1926; Krenn y Aspöck, 2012). Para evitar la coagulación de la sangre los flebotomos secretan diferentes compuestos en la saliva como sustancias anticoagulantes, vasodilatadoras e inmunomoduladoras (Léger y Depaquit, 1999). Desde el momento de la picadura hasta que la sangre comienza a ser ingerida hay un intervalo de unos 15 a 30 segundos. En ese momento, cuando las hembras infectadas por *Leishmania* spp. se están alimentando, los parásitos pueden penetrar en la herida realizada por el flebotomo, puesto que después, cuando la sangre comienza a penetrar en la cavidad bucal, la presión negativa impedirá el paso de los promastigotes (Adler y Theodor, 1926). Una vez la sangre ha llegado a la cavidad bucal, es conducida a través del esófago hasta el estómago, donde



es almacenada. Con el fin de aislar y protegerse de posibles agentes infecciosos, las células epiteliales del estómago secretan una membrana peritrófica (MP), que rodea y encierra la sangre ingerida, en cuyo interior tiene lugar la digestión de la sangre (Figura 22) (Lehane, 1997; Warburg, 2008).

Figura 22. Estómago de flebotomo en el que se observa la sangre ingerida rodeada por la MP. Fuente: modificado de Sadlova y Volf (Vdorak y col., 2018).

La búsqueda de las fuentes de alimentación es una actividad que se efectúa generalmente en horas crepusculares y nocturnas. Los flebotomos se ven atraídos por el CO₂ que desprenden los animales, por su temperatura, así como por ciertos olores que emiten; pero también influye el comportamiento de los posibles hospedadores y la actividad de estos. Algunas especies de flebotomos son más estrictas a la hora de escoger su fuente de alimentación, sin embargo, existen especies que presentan un amplio rango de potenciales hospedadores y se alimentan de aquellos animales que estén más accesibles, lo que se define como comportamiento oportunista. Es el caso de algunos flebotomos, como *P. perniciosus* o *Lutzomyia pseudolongipalpis*, en los cuales los estudios de preferencias alimentarias encuentran una gran diversidad de fuentes (Morrison y col., 1993; Agrela y col., 2002; Bongiorno y col., 2003; Rossi y col., 2008; Maia y col., 2015; González y col., 2017). Así mismo, es usual que las hembras de algunas especies se alimenten preferentemente en zonas de los animales con pelo corto o sin pelo, como pueden ser las orejas y las patas de roedores, cánidos y lagomorfos (Figura 23) (Rossi y col., 2008; Ready, 2013).



Así mismo, es usual que las hembras de algunas especies se alimenten preferentemente en zonas de los animales con pelo corto o sin pelo, como pueden ser las orejas y las patas de roedores, cánidos y lagomorfos (Figura 23) (Rossi y col., 2008; Ready, 2013).

Figura 23. Hembras de *P. perniciosus* alimentándose sobre un conejo. Fuente: modificado de Jiménez y col., 2014.

1.2.7. El parásito en el vector

Dependiendo de la región del tubo digestivo de los flebotomos donde se desarrollen los promastigotes se distinguen tres grupos: Hipopilaria, aquellas especies que se desarrollan sólo en el tubo digestivo posterior y que corresponde mayoritariamente a las especies del género *Sauroleishmania* que infectan a reptiles; Peripilaria, engloba aquellas especies que se desarrollan en la parte anterior del tubo digestivo posterior y luego migran hacia la parte anterior del tubo digestivo medio, en este grupo se incluyen las especies del subgénero *Viannia*; y Suprapilaria, en el que los parásitos se desarrollan sólo en la parte media y anterior del tubo digestivo medio, grupo en el que se incluyen las especies del subgénero *Leishmania* (Figura 24) (Lainson y col., 1979).

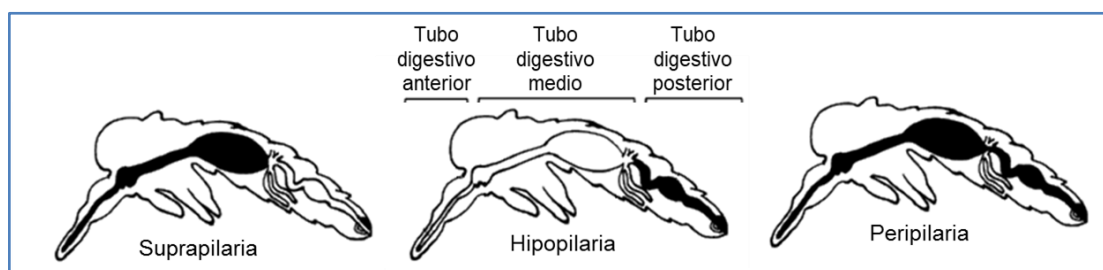


Figura 24. Representación de los tres grupos de *Leishmania* según el lugar de desarrollo del parásito dentro del tubo digestivo del flebotomo. Fuente: modificado de Kaufer y col., 2017.

1.2.7.1. Metaciclologénesis y transmisión del parásito

Las primeras evidencias de que el parásito es transmitido a través de la picadura de las hembras de flebotomo fueron halladas en la primera mitad del siglo XX (Shortt y col., 1931; Adler y Ber, 1941) y ya entonces se sospechaba que existía una forma infectiva responsable de esta transmisión. Pero hasta la década de 1980 no se describió el desarrollo de un estadio infectivo dentro del aparato digestivo de los flebotomos (Sacks y Perkins, 1984, 1985). El ciclo que sufre el parásito dentro del aparato digestivo de la hembra del flebotomo desde que es ingerido, cuando ésta se alimenta de un reservorio infectado, hasta que se convierte en la forma infectiva, que podrá ser transmitida a un nuevo reservorio se conoce como metaciclologénesis (Figura 25). Los cambios fisiológicos como la disminución de la temperatura y el aumento del pH que ocurren tras el paso desde el vertebrado al interior del tubo digestivo del flebotomo desencadenan la transformación y el posible desarrollo del parásito en el vector. El ciclo comienza cuando los amastigotes presentes en el interior de las células sanguíneas, ingeridos con la sangre, se liberan tras la digestión enzimática de estas células y se transforman en formas con un flagelo corto denominadas promastigotes procíclicos. Este estadio es la primera forma replicativa que prolifera dentro de la sangre todavía en proceso de digestión, rodeada por la MP (Bates y Rogers, 2004; Kamhawi, 2006). Tras 48-72 h, los promastigotes procíclicos comienzan a diferenciarse en formas más alargadas y con flagelo de mayor longitud, denominadas nectomonas, las cuales consiguen evitar ser excretadas con los restos de sangre digeridos mediante su unión al tubo digestivo a través de la producción de una clase de lipofosfoglicano (LPG) propia de esta forma del parásito, el cual es reconocido por unos receptores presentes en el tubo digestivo del flebotomo (Sacks y col., 2000; Ilg, 2001; Kamhawi, 2006). Posteriormente, las nectomonas se liberan de la MP y se desplazan hacia zonas anteriores del tubo digestivo. Aquí se transforman en formas más cortas, llamadas leptomonas, las cuales comienzan un nuevo ciclo proliferativo. Estas leptomonas localizadas en la parte anterior del tubo digestivo, comienzan a secretar un gel (PSG, *promastigote secretory gel*) que acaba produciendo un tapón que bloquea la VE. Finalmente, las leptomonas siguen dos rutas: por un lado se pueden diferenciar en haptomonas, que se quedan adheridas a la pared del tubo formando agrupaciones que contribuyen al taponamiento de la VE, o se pueden diferenciar en promastigotes metacíclicos, que son las formas infectivas y que se caracterizan por su alta motilidad, no ser formas replicativas y poseer un largo flagelo que duplica el tamaño de la célula y que serán inoculadas tras una nueva ingesta de sangre por parte de la hembra del flebotomo (Sacks y Perkins, 1985; Bates, 2007). Estos promastigotes metacíclicos expresan un LPG modificado que evita su anclaje al epitelio intestinal, asegurando su disponibilidad para la transmisión por parte de la hembra de flebotomo (Sacks y Kamhawi, 2001; Bates y Rogers, 2004). Además, estas formas parasitarias poseen cualidades necesarias para sobrevivir tras ser inoculadas en el mamífero, como la resistencia a la lisis mediada por complemento, una mayor facilidad de infectar las células fagocitarias del animal ya que producen una clase de LPG y de

proteínas fosfoglicosiladas implicadas en la unión del promastigote a los macrófagos (Bates y Tetley, 1993; Handman y Bullen, 2002).

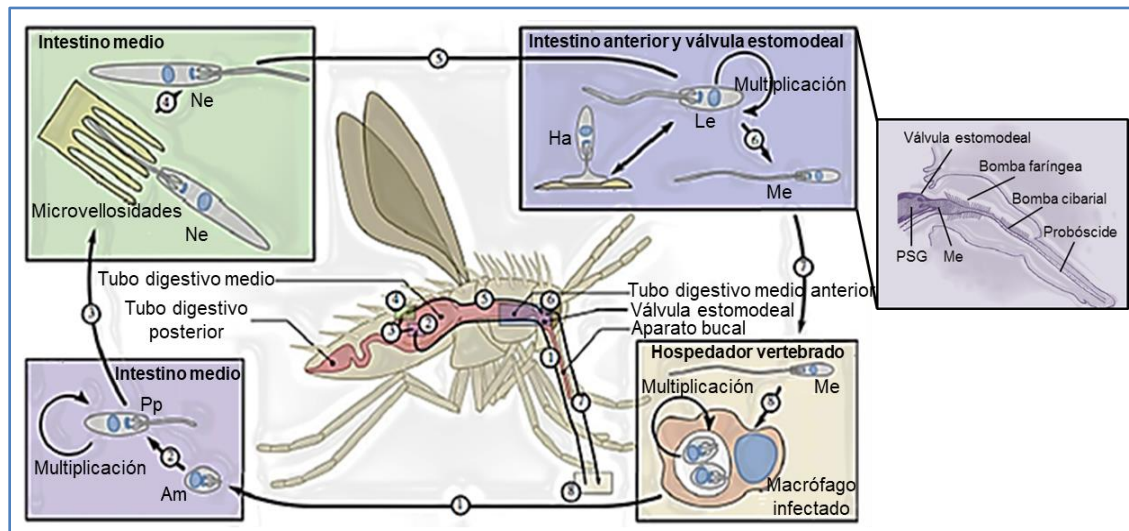


Figura 25. Desarrollo de *Leishmania* dentro del aparato digestivo de un flebotomo. Tras la ingesta de células infectadas con amastigotes de *Leishmania* a partir de un hospedador infectado, estos amastigotes se diferencian en promastigotes procíclicos (1-2), los cuales se multiplican. Estos promastigotes procíclicos se convierten en nectomonas, que escapan de la membrana peritrófica y se adhieren a las microvellosidades en el tubo digestivo medio (3-4) antes de pasar a la parte anterior del tubo digestivo y llegar a la VE, donde se diferencian en leptomonas (5-6). Aquí, las leptomonas se diferencian en haptomonas, que se unen a la VE, o en promastigotes metacíclicos que son la forma infecciosa para los mamíferos y que se transmiten cuando la hembra del flebotomo vuelve a ingerir sangre de un hospedador vertebrado (6-7). Am: amastigotes; Le: leptomonas; Ne: nectomonas; Ha: haptomonas; Me: promastigotes metacíclicos; PSG: gel secretado por promastigotes leptomonas. Fuente: Bates, 2007; Sunter y Gull, 2017.

En un estudio reciente se ha observado que tras una segunda ingesta de sangre un alto porcentaje de promastigotes metacíclicos parecen retornar a la forma de leptomona. Estas formas, denominadas retroleptomonas, sufrirían un nuevo ciclo de replicación para posteriormente volver a diferenciarse en promastigotes metacíclicos (Serafim y col., 2018) (Figura 26). Este mismo estudio también describe que en aquellas hembras de flebotomo que ingieren sangre por segunda vez, tras una primera ingesta infecciosa, las haptomonas forman agrupaciones concéntricas de mayor tamaño que en aquellas hembras que sólo han ingerido sangre una sola vez. Estas agrupaciones actuarían conjuntamente con el PSG en el bloqueo de la VE (Walters, 1993; Sacks y Perkins, 1985; Gossage y col., 2003; Kamhawi, 2006; Bates, 2007; Dostálová y Volf, 2012). Así mismo, Moraes y col., 2018 han observado en sus experimentos que la carga parasitaria es mayor en aquellas hembras que han realizado una segunda ingesta de sangre y que la VE presenta mayor dilatación que en aquellas hembras que solo han tomado sangre una vez, aunque estas diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas.

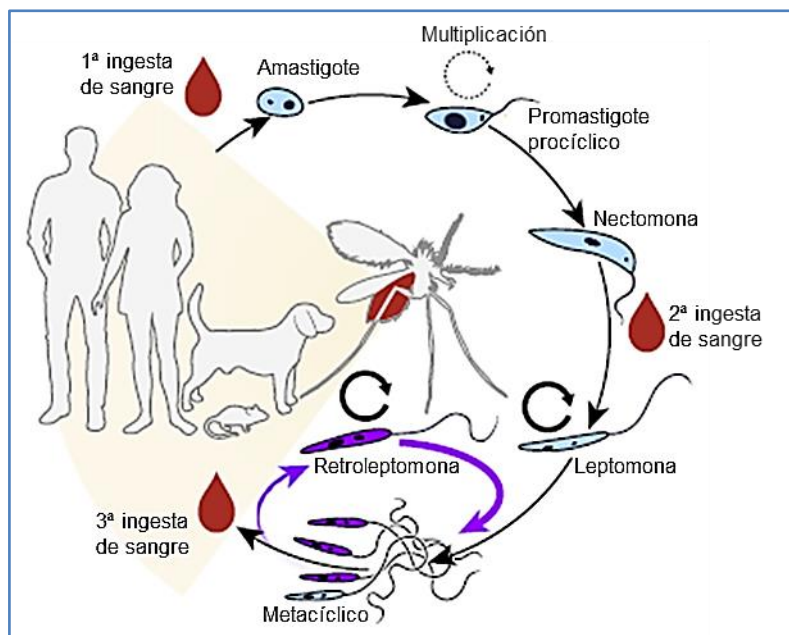


Figura 26. Esquema propuesto por Serafim y col., 2018 en el que las ingestas de sangre posteriores a una primera ingesta infectiva promueven el establecimiento de *Leishmania* al desencadenar la diferenciación inversa de los promastigotes metacíclicos en retroleptomonas multiplicativas que amplifican la carga parasitaria en el tubo digestivo del flebotomo. Fuente: modificado de Serafim y col., 2018.

Este proceso de metaciclogénesis que tiene lugar en el interior del tubo digestivo de los flebotomos necesita de mecanismos que eviten la eliminación del parásito junto con los restos de sangre digerida. Para ello, los promastigotes insertan el flagelo en las microvellosidades del epitelio digestivo del flebotomo, anclándose y evitando así su expulsión durante la eliminación de la sangre digerida. No se han esclarecido exactamente los mecanismos de esta unión, aunque parecen ser específicos de los estadios medios, nectomonas y leptomonas, estando ausentes en promastigotes procíclicos y metacíclicos, los cuales serían estadios libres (Wilson y col., 2010). Estos mecanismos de unión entre los promastigotes y el epitelio digestivo de los flebotomos parecen diferir entre las especies de *Leishmania* y son fundamentales para la descripción de la competencia vectorial de una especie de flebotomo (apartado 1.2.7.3) (Volf y Myskova, 2007).

Para que la transmisión de los promastigotes metacíclicos tenga lugar se han descrito dos posibles mecanismos. Por un lado, las formas infectivas serían inoculadas en la piel del animal durante la ingesta de sangre por parte de las hembras de flebotomo (Adler y Theodor, 1935). Por otro lado, los promastigotes presentes en la VE serían regurgitados en un proceso de reflujo en el momento de la ingesta de sangre (Rogers y col., 2004). Este proceso de regurgitación de los promastigotes sería consecuencia del bloqueo de la parte anterior del tubo digestivo y/o de la VE debido a la secreción de PSG por parte de las haptomonas, que se compone mayoritariamente de proteofosfoglicano filamentoso (fPPG, *filamentous proteophosphoglycan*), y a la formación de agrupaciones concéntricas de estas formas flageladas (Rogers y col., 2004; Kamhawi, 2006). En este proceso

también intervienen unas enzimas secretadas por las haptomonas, las quitinasas, que dañan el epitelio de la VE (Rogers y col., 2008). Estos mecanismos parecen intervenir en el comportamiento del flebotomo a la hora de alimentarse, ya que el bloqueo producido en la VE interfiere en la ingesta de sangre, provocando que el flebotomo deba realizar un repetido número de intentos para alimentarse, ya sea sobre un mismo reservorio o sobre varios. Así, el flebotomo infectado puede inocular una mayor carga parasitaria y transmitir el parásito a un mayor número de hospedadores (Rogers y Bates, 2007).

Además de los mecanismos inherentes del parásito para su desarrollo y supervivencia dentro del tubo digestivo del flebotomo, existen indicios de que la microbiota presente en su aparato digestivo es fundamental para que el parásito pueda sobrevivir y ser transmitido. Estudios en los que se alteró la microbiota de hembras de flebotomo experimentalmente infectadas mediante la administración de antibióticos, han demostrado que el parásito no era capaz de multiplicarse y llevar a cabo el proceso de metaciclogénesis y, por lo tanto, no tenía lugar la transmisión a un nuevo hospedador vertebrado (Kelly y col., 2017).

1.2.7.2. Incriminación de los flebotomos como vectores

Están descritas cerca de 800 especies de flebotomos, 464 de ellas en el Nuevo Mundo y 375 en el Viejo Mundo. De todas ellas, 78 son vectores probados de alguna especie de *Leishmania* y otras 88 son actualmente sospechosas de poder serlo (Akhoundi y col., 2016). El proceso de incriminación de una especie de flebotomo como vector es un proceso lento en el que se deben cumplir varios criterios, enumerados a continuación. Los 5 primeros se consideran los criterios clásicos (Killick-Kendrick, 1990b; OMS, 2010), mientras que los 3 últimos se han incorporado más recientemente tras el desarrollo de nuevas tecnologías, basados en datos epidemiológicos y modelos matemáticos (Ready, 2013):

- El flebotomo debe ser antropófilo. Para comprobarlo, se pueden realizar capturas utilizando cebo humano, aunque esta técnica es éticamente cuestionable actualmente. Otra forma de comprobar si el flebotomo presenta apetencia por el humano es estudiar el origen de la sangre ingerida.
- En el caso de las zoonosis, el flebotomo debe alimentarse de los reservorios. La confirmación de que un flebotomo se alimenta de un reservorio es una buena prueba de su actuación como vector. Para determinar las preferencias alimentarias de una población de flebotomos se pueden realizar capturas mediante trampas tipo *Disney*, que son útiles para animales pequeños, mientras que para animales mayores se utilizan trampas tipo tienda. Igualmente útil es la identificación de la sangre ingerida por las hembras capturadas.
- Se debe encontrar la misma especie de *Leishmania* infectando al flebotomo y al reservorio, ya sea humano u otro vertebrado. Para ello es necesario encontrar e

identificar los parásitos en el tubo digestivo del flebotomo y compararlos con los aislados en los reservorios infectados. El protocolo habitual consiste en disecar las hembras de los flebotomos e identificar los parásitos presentes en el tubo digestivo anterior. A continuación, se comparan mediante análisis bioquímico o molecular los parásitos aislados de los flebotomos con los aislados en seres humanos u otros animales infectados con el parásito.

- El parásito debe poder desarrollarse y evolucionar a las formas infectivas dentro del aparato digestivo del flebotomo, persistiendo incluso después de que la sangre se haya digerido y expulsado. Para comprobar esto se puede analizar la intensidad de la infección mediante la disección de hembras capturadas vivas y su examen bajo microscopio de contraste de fases, realizando la determinación de la carga parasitaria a través de qPCRs o llevando a cabo la infección experimental de colonias de flebotomos mantenidas en el laboratorio.
- El flebotomo debe ser capaz de transmitir el parásito al hospedador cuando se alimenta de él. La verificación experimental de este criterio es compleja ya que, por un lado, algunas especies de flebotomos son difíciles de mantener en un laboratorio, y por otro lado, las hembras raramente sobreviven a la oviposición en condiciones experimentales, por lo que no es posible que realicen una segunda alimentación que permita comprobar tal transmisión.
- Se debe demostrar una estrecha relación ecológica entre el flebotomo, el hospedador vertebrado y el parásito.
- Demostrar mediante modelos matemáticos que utilizan datos retrospectivos que el flebotomo es esencial para la transmisión del parásito.
- Probar mediante modelos matemáticos basados en un plan de control que la incidencia de la enfermedad disminuye al producirse un descenso en la densidad del flebotomo.

De todos estos criterios, se consideran imprescindibles: demostrar que la especie de flebotomo sospechosa de ser transmisora se alimenta del hospedador en la naturaleza y encontrar el mismo parásito dentro del flebotomo y del animal infectado (Killick-Kendrick, 1999).

1.2.7.3. Competencia vectorial

Los flebotomos se pueden dividir en dos grupos atendiendo a si son capaces de actuar como vectores de diferentes especies de *Leishmania* (vectores permisivos), o si solamente pueden ser vectores de una sola especie (vectores específicos). Entre los flebotomos específicos se encuentran *P. papatasi* y *Phlebotomus sergenti*, que solamente son capaces de transmitir *Leishmania major* (Killick-Kendrick y col., 1994; Pimenta y col., 1994) y *L. tropica* (Killick-Kendrick, 1995; Kamhawi y col., 2000), respectivamente. Por

otro lado, entre las especies de flebotomos que son capaces de transmitir varias especies de *Leishmania* se encuentran las especies transmisoras de parásitos del complejo *L. donovani* (Walters y col., 1993; Pimenta y col., 1994; Volf y Myskova, 2007). Las principales barreras que existen para el desarrollo completo de los parásitos dentro del aparato digestivo del flebotomo son las siguientes, según Sacks y Kamhawi, 2001:

- La acción de las enzimas digestivas, que pueden inhibir el desarrollo inicial del parásito tras la ingesta de sangre.
- La MP, que puede actuar como barrera física que impide la migración de los promastigotes.
- La excreción de parásitos con la sangre digerida, que puede derivar en una pérdida de poder infectivo.
- La anatomía y fisiología de la parte anterior del tubo digestivo del flebotomo, que puede impedir la migración de los promastigotes metacíclicos y su transmisión durante la ingesta de sangre

Para que el correcto establecimiento y desarrollo del parásito en el interior del flebotomo tenga lugar se han identificado diversas interacciones entre ambos a nivel molecular. Por ejemplo, en la unión específica de *L. major* en *P. papatasi* se han identificado modificaciones en el LPG de la superficie del parásito (Pimenta y col., 1992; Butcher y col., 1996; Kamhawi, 2006) que se une a un receptor específico PpGalec en el tubo digestivo (Kamhawi y col., 2004; Kamhawi, 2006). Por otro lado, en los flebotomos permisivos se ha comprobado la presencia de otro tipo de receptores en el epitelio del tubo digestivo que parecen ser los encargados de la unión a las diferentes especies de *Leishmania*. Estos receptores están formados por proteínas o-glicosiladas con epítomos de n-acetilgalactosamina (GalNac) (Myskova y col., 2007; Volf y Myskova, 2007).

1.3. Detección de *Leishmania* spp. y otros tripanosomátidos en flebotomos

La visualización de los promastigotes de *Leishmania* en el tubo digestivo de las hembras de flebotomo es esencial para la incriminación de una determinada especie como vector del parásito en una región concreta. Así mismo, es posible detectar la presencia de otros tripanosomátidos diferentes a *Leishmania*. Sin embargo, la mera presencia de estos parásitos en el tubo digestivo no implica automáticamente su papel como vector, puesto que también debe probarse su capacidad transmisora, tal como se expone en el apartado 1.2.7.2. A continuación se describen los diferentes procedimientos para la detección e identificación de *Leishmania* y otros tripanosomátidos en hembras de flebotomos infectadas.

1.3.1. Visualización de promastigotes mediante disección del tubo digestivo

La disección se realiza en hembras anestesiadas, normalmente utilizando CO₂, que se disponen sobre una gota de tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*). Con ayuda de agujas entomológicas estériles se extrae el tubo digestivo fuera del abdomen para luego ser examinado en un microscopio con contraste de fases (ver apartado 3.3 para más detalle) (Rioux y col., 1984). Esto permite detectar la presencia de promastigotes, así como la estimación semicuantitativa del número de parásitos y, sobre todo, permite su localización dentro del tubo digestivo (Myskova y col., 2008). Este último punto es fundamental porque la presencia de formas parasitarias en la VE es un indicador de su capacidad vectorial (Killick-Kendrick, 1990a). Otra ventaja importante de este procedimiento es la posibilidad de aislar y cultivar los promastigotes para su posterior caracterización, aunque existe un alto riesgo de contaminación por hongos y/o bacterias. Sin embargo, a pesar de la gran utilidad de esta técnica en los estudios entomológicos, es una técnica muy laboriosa que consume mucho tiempo debido a que se deben manipular un elevado número de especímenes, que deben estar vivos. Además, se necesita personal altamente cualificado, tanto para llevar a cabo la disección de los flebotomos como para la visualización de los promastigotes en el tubo digestivo (Sharma y Singh, 2008).

En diversos países de la cuenca mediterránea se ha llevado a cabo el estudio de las tasas de infección en flebotomos, arrojando importante información sobre el porcentaje de flebotomos infectados y el riesgo de transmisión existente en las diferentes regiones. Es el caso de países como Israel (Svobodova y col., 2006), Turquía (Svobodová y col., 2009; Sari y col., 2015; Kavur y col., 2015, 2017; Özbel y col., 2016;), Albania (Velo y col., 2017), Georgia (Giorgobiani y col., 2012), Italia (Maroli y col., 1987, 1988; Rossi y col., 2008), Francia (Rioux y col., 1973, 1984) y Portugal (Pires, 1984; Alves-Pires y col., 2001). En España la transmisión de *L. infantum* por parte de *P. ariasi* y *P. perniciosus* fue determinada mediante la observación del parásito en flebotomos capturados en Cataluña en primer lugar (Rioux y col., 1986) y posteriormente en Zaragoza (Lucientes-Curdi y col., 1988). Así mismo, otros estudios entomológicos llevados a cabo en nuestro país mediante disección han descrito tasas de infección de 0,27%-4,59% (Rioux y col., 1986; Morillas-Márquez y col., 1991; Martín-Sánchez y col., 1994, 2006).

La disección de hembras de flebotomo ha suscitado también la sospecha de la implicación de algunas especies en la transmisión de tripanosomátidos diferentes a *Leishmania* al observarse su presencia en su tubo digestivo (Anderson y Ayala, 1968; Zeledón y Rosabal, 1969; Gramiccia y col., 1989; col., 2010; Calzolari y col., 2018).

Por otro lado, para la caracterización de los parásitos detectados mediante disección, se ha utilizado tradicionalmente la técnica de referencia de caracterización de *Leishmania*: MLEE (apartado 1.1.3) (Maroli y col., 1987, 1988; Rioux y col., 1973, 1984a, 1984b; Martín-Sánchez y col., 1994, 2006; Guilvard y col., 1996; Tabbabi y col., 2011). Sin embargo, como ya se ha señalado (apartado 1.1.3), esta técnica presenta diversas

dificultades e inconvenientes, por lo que se han desarrollado nuevas técnicas, que se explican a continuación.

1.3.2. Detección e identificación mediante métodos moleculares

Como se ha mencionado en el apartado 1.3.1., la identificación y caracterización de los aislados obtenidos tras la disección de flebotomos es una tarea laboriosa y tediosa. Para sustituir la técnica de MLEE, inicialmente se diseñaron técnicas basadas en la detección de antígenos de *Leishmania* a partir de productos obtenidos de la homogeneización de flebotomos, como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) mediante anticuerpos (Ac) monoclonales (McMahon-Pratt y col., 1983; Shaw y col., 1987), el radioinmunoensayo competitivo en fase sólida utilizando también Ac monoclonales (Frankenburg y col., 1985) o el enzoinmunoensayo (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) (Adini y col., 1998). Posteriormente, la necesidad de métodos para el diagnóstico clínico más sensibles y específicos, junto con el desarrollo de técnicas basadas en la PCR, ha dado lugar a un elevado número de metodologías moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos de diferentes dianas génicas (ver apartado 1.1.3). Estas técnicas también se han venido aplicando en la detección de *Leishmania* en los flebotomos capturados con el fin de determinar las tasas de infección y para la caracterización de la especie o genotipo del parásito circulante en la región. Estas técnicas basadas en la detección de fragmentos de ADN son muy sensibles y específicas, además de más sencillas y rápidas que la MLEE y la detección de Ac. Así mismo, la mayoría de estudios coinciden en que la detección de *Leishmania* en flebotomos mediante PCR es más eficiente que mediante el examen de los tubos digestivos en el microscopio (Sharma y Singh, 2008). Estos procedimientos permiten detectar aquellos flebotomos infectados mediante la detección de fragmentos de material génico de *Leishmania* presente en el díptero, pero también se realiza la identificación mediante PCR de aislados a partir de la disección de flebotomos. Este procedimiento ha permitido implicar a *Phlebotomus balcanicus* como vector de *L. infantum* en un foco de LV en Georgia, utilizando una PCR basada en la amplificación de un fragmento de la proteína Hsp70 seguida de su secuenciación y posterior análisis mediante programas bioinformáticos (Giorgobiani y col., 2012). Así mismo, Kato y col., 2010 durante la disección de ejemplares de *Phlebotomus kazeruni* encontraron tripanosomátidos diferentes de *Leishmania* que fueron identificados como tripanosomas cercanos a los encontrados en anfibios mediante amplificación y posterior secuenciación de fragmentos del gen *cytb*, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa glicosoma (gGAPDH, *glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase*) y ARNr SSU. Esta misma metodología fue utilizada en la identificación de *Trypanosoma avium* en ejemplares de *Lutzomyia* (H.) *caballeroi* (Kato y col., 2011) y de tripanosomas del grupo *Trypanosoma theileri* en *Phlebotomus perfiliewi* capturados en Italia (Calzolari y col., 2018).

En el caso de la detección directa en flebotomos se debe realizar un proceso previo de extracción de ADN. Este proceso de extracción muestra diversas dificultades como la

necesidad de realizar un proceso de lisis eficiente que desnaturalice la quitina del exoesqueleto y elimine la elevada cantidad de proteínas que pueden dificultar la obtención de ADN de buena calidad. Además, en aquellas hembras con sangre ingerida, los componentes del grupo hemo de la sangre pueden dar lugar a la inhibición de las posteriores reacciones de PCR (Al-Soud y Rådström, 2001). Diferentes trabajos han descrito la optimización de procedimientos de extracción de ADN de flebotomos, en los que se modifican diversos pasos con el fin de mejorar los protocolos y obtener una mayor concentración de ADN y de mejor calidad (Casaril y col., 2017). Algunos estudios realizan la extracción a partir de *pools* de flebotomos de una misma especie, agilizando así el proceso (Martín-Sánchez y col., 2006; Demir y Karakuş, 2015; Kavur y col., 2017; Velo y col., 2017).

Existen numerosos estudios entomológicos en varios países de la cuenca mediterránea que describen las tasas de infección de los flebotomos implicados en regiones endémicas o en brotes de leishmaniosis. En Israel, los estudios realizados por Svobodova y col., 2006 establecen una tasa del 18% de *P. sergenti* infectados en un foco de LC. En Turquía los estudios se han llevado a cabo analizando *pools* de flebotomos y describen tasas de hasta el 11,76% de flebotomos infectados (Demir y Karakuş, 2015; Kavur y col., 2015, 2017; Karakuş y col., 2017;). En su país vecino, Albania, han encontrado tasas superiores de hasta el 14,8% (Ayhan y col., 2016; Velo y col., 2017). Estudios realizados en 7 regiones de Grecia determinan tasas de infección mediante una PCR semianidada del ADNk en la que encuentran un 6,7% de hembras infectadas sin sangre, mientras que en las hembras con sangre la tasa es del 4,8% (Aransay y col., 2000). En el continente africano, Ajaoud y col., 2015 también han determinado las tasas de infección en hembras con sangre y sin sangre capturadas en un foco de LC en Marruecos, encontrando una tasa de infección mayor en aquellas hembras que presentaban sangre en su abdomen (25%) con respecto a las hembras que no mostraban sangre ingerida (3,16%). En este mismo país, otros estudios en diferentes focos han podido establecer las especies de *Leishmania* implicadas mediante la detección e identificación del parásito en flebotomos y pacientes de la región (Ajaoud y col., 2013; Es-Sette y col., 2014; Mhaidi y col., 2018). Así mismo, en Túnez se ha postulado la posible implicación de *Phlebotomus langeroni* como vector de *L. infantum* (Guerbouj y col., 2007), además de encontrar por primera vez un ejemplar de *Sergentomyia clydei* infectado por *L. major* (Ayari y col., 2016) y describir la evolución en diferentes focos de LC del país (Barhoumi y col., 2016; Benabid y col., 2017; Jaouadi y col., 2017).

En Francia la aplicación de métodos moleculares ha permitido detectar la presencia simultánea de *Leishmania* y virus Massilia en flebotomos capturados en una zona endémica (Faucher y col., 2014). En Italia son numerosos los estudios que han determinado las tasas de infección y su evolución en diferentes puntos del país, describiendo tasas del 2,9%-51,6% (Gómez-Saladín y col., 2005; Reale y col., 2008; Rossi y col., 2008; Torina y col., 2008; Lisi y col., 2014). Los trabajos realizados por Gómez-Saladín y col., 2005 y Reale y col., 2008 son de los primeros estudios llevados a

cabo en Europa mediante protocolos de qPCR para la detección de flebotomos infectados. En este sentido, Myskova y col., 2008 determinan la estimación de la carga parasitaria en hembras de flebotomo infectadas con *Leishmania* spp., realizando sus estudios con *P. duboscqi*. La importancia del conocimiento de la carga parasitaria en flebotomos se fundamenta en que proporciona información valiosa sobre los patrones de transmisión en una región en particular. Por ello, se ha extendido la aplicación de la qPCR en diferentes estudios entomológicos, como los realizados en *P. sergenti* capturados en Irán (Aghaei y col., 2014); *P. papatasi* y *Phlebotomus alexandri* en Irak (Coleman y col., 2009), *P. perfiliewi*, *P. perniciosus* y *Phlebotomus neglectus* en Italia (Dantas-Torres y col., 2014); *Sergentomyia dentata*, *Phlebotomus tobbi*, *P. alexandri* y *P. neglectus* en Turquía (Karakuş y col., 2017) y diferentes especies de *Lutzomyia* en Brasil (Ranasinghe y col., 2008; Bezerra-Vasconcelos y col., 2011; Cunha y col., 2014; Pita-Pereira y col., 2012; Rodrigues y col., 2016).

Volviendo a la Península Ibérica, en Portugal se han llevado a cabo numerosos estudios entomológicos en los que la detección de *Leishmania* mediante métodos moleculares ha mostrado valores muy similares a los encontrados mediante disección. De esta manera, el porcentaje de dípteros infectados no alcanza el 1% (Maia y col., 2009, 2013, 2015; Branco y col., 2013). Además, en este mismo país se han detectado ejemplares de *Sergentomyia minuta* infectados por *L. major* (Campino y col., 2013), *L. infantum* (Pereira y col., 2017) y también por *Leishmania* spp. similar a *Leishmania tarentolae* (Maia y col., 2015). Ya en España, se ha determinado la tasa de infección en diferentes puntos del país. Por ejemplo, en Granada se han descrito tasas de *P. perniciosus* infectados del 0,45% (Martín-Sánchez y col., 2006), mientras que otro estudio en la misma provincia encontró un 47,6% de *P. langeroni* infectados (Sáez y col., 2018). Estos dos trabajos realizaron la detección de *L. infantum* mediante un protocolo de PCR-ELISA que combina la amplificación de un fragmento de ADNk y la estimación de la carga parasitaria mediante un ELISA. En Cataluña, Alcover y col., 2012, utilizando una PCR anidada de la región ITS1 seguida de RFLP, encontraron una alta variabilidad en las tasas de infección, siendo del 76,6% en la región del Priorat, del 18,9% en Ainet del Besan, mientras que fueron del 0% en Sant Just Desvern. Otros estudios realizados en Extremadura solamente encontraron un ejemplar de *P. perniciosus* infectado por *L. infantum* de los 435 analizados (0,23%), además de describir por primera vez en dos hembras de *S. minuta* la presencia de una especie de *Leishmania* similar a *L. tarentolae*, tal como se había descrito previamente en Portugal. En ambos casos la detección e identificación del parásito se realizó mediante PCR de la región ITS y su posterior secuenciación (Bravo-Barriga y col., 2016a, 2016b). Finalmente, en el brote de leishmaniosis humana del suroeste de la Comunidad de Madrid (CM), los primeros estudios entomológicos realizados en la zona mostraron tasas de infección del 58,5% en *P. perniciosus* capturados durante septiembre y octubre de 2011 (Jiménez y col., 2013). La detección e identificación en este trabajo se llevó a cabo mediante amplificación de un fragmento de ADNk, del gen *cpb* y de la región ITS1. En este brote también se ha descrito la infección por *Leishmania* spp. en hembras de *S. minuta* (González y col., 2016a).

1.4. Determinación del origen de la sangre ingerida por hembras de flebotomo

Se piensa que los hábitos alimenticios de los insectos hematófagos surgieron bien accidentalmente, cuando insectos primariamente fitófagos se alimentaron de animales y posteriormente desarrollaron aparatos digestivos capaces de utilizar la sangre como fuente de alimento, o bien debido a la estrecha relación entre algunos insectos con aparato masticador y los animales, en la que estos insectos ocasionalmente comenzaron a alimentarse de los animales, pasando a ser la sangre su fuente principal de alimento y evolucionando su aparato picador. A través de esta evolución, los insectos se habrían vuelto dependientes de ciertas fuentes de alimentación, lo que en parte explicaría las preferencias alimentarias de algunos insectos hematófagos (Takken y Verhulst, 2013).

La identificación de las fuentes de alimentación de insectos hematófagos proporciona valiosa información sobre las preferencias alimentarias en su entorno natural. En el caso de que aquellos insectos transmisores de patógenos, como es el caso de los flebotomos, esta información podría dar la pista sobre potenciales reservorios. Se trata de datos esenciales a la hora de incriminar a una especie como vector, así como para conocer el ciclo de transmisión, permitiendo el desarrollo de estrategias de control eficaces. Así mismo, identificar las preferencias alimentarias permite determinar el grado de contacto entre el vector y la población de hospedadores susceptibles en una región o zona determinada, y conocer así el riesgo de exposición. En el caso de la identificación de sangre humana, se puede determinar el grado de antropofilia de una especie y el riesgo de transmisión de un agente patógeno a la población (Killick-Kendrick, 1999; Alexander y Maroli, 2003; Haouas y col., 2007; Abbasi y col., 2009; Ready, 2013).

Para la identificación de las fuentes de alimentación de flebotomos se han desarrollado diferentes técnicas. Los primeros estudios estaban basados en técnicas serológicas como la contrainmunolectroforesis (Tesh y col., 1971; Guy y col., 1984), prueba del anillo de precipitina (Kostich, 1951), prueba de precipitación (Morrison y col., 1993), ensayos de difusión en geles de agarosa (Srinivasan y Panicker, 1992), métodos de doble difusión de *Ouchterlony* (Živković y col., 1973) o ELISA competitivo (Colmenares y col., 1995). Estas técnicas permiten identificar la fuente de alimentación hasta el nivel de especie con una especificidad alta; sin embargo, presentan inconvenientes como la presencia de reacciones cruzadas entre especies próximas, la necesidad de producir anticuerpos específicos para los potenciales vertebrados presentes en la zona de estudio y la incapacidad de revelar nuevas fuentes de alimentación (Haouas y col., 2007). Otro inconveniente de estas técnicas es el pequeño volumen de sangre ingerida por un flebotomo (hasta 0,5 mg) que no permite realizar un gran número de ensayos, tal como requieren estas metodologías (Ready, 1979).

Debido a estos inconvenientes, las técnicas serológicas se han visto reemplazadas por métodos moleculares, ampliamente utilizados en la caracterización del origen de la sangre ingerida por insectos hematófagos en la actualidad. La aplicación de diversas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR, junto con el conocimiento

de una cantidad cada vez mayor de secuencias de vertebrados, han permitido aumentar la especificidad en la identificación de las fuentes de alimentación. Numerosos estudios describen diferentes marcadores moleculares, siendo los más utilizados (revisado por Kent, 2009) los siguientes:

- Genes mitocondriales: se encuentran en un alto número de copias dentro de las células, por lo que las reacciones de amplificación de estos genes son muy sensibles y permiten detectar pequeñas cantidades de ADN. Por otro lado, su evolución ha sido mayor en comparación con los genes nucleares, haciendo posible la diferenciación entre organismos filogenéticamente muy cercanos. Los genes mitocondriales más comúnmente utilizados son el *cytb* y el *COI*. Una de las técnicas más usadas consiste en la amplificación de fragmentos de estos genes seguida de su secuenciación y posterior análisis de homologías en bases de datos como el Genbank® o el *Barcode of Life Data System (DNA Barcoding)*, para los genes del *cytb* y del *COI*, respectivamente. En la primera de las bases de datos se pueden encontrar más de 400.000 secuencias de animales cordados; mientras que en la segunda se encuentran más de 500.000. La amplificación del gen *cytb* se ha utilizado también en combinación con otras técnicas como el análisis de heterodúplex (Boakye y col., 1999; Lee y col., 2002), PCR-RFLP (Steuber y col., 2005; Oshaghi y col., 2006; González y col., 2015) y qPCR (Sales y col., 2015).
- Genes del ARNr: son genes altamente conservados utilizados ampliamente para el análisis de filogenias. Se encuentran también en un alto número de copias, como los mitocondriales, pero su desarrollo ha sido más lento que estos, por lo que la identificación de las fuentes de alimentación no es tan precisa (Knowlton y Weigt, 1998; Hebert y col., 2003).
- Genes nucleares: son genes de una sola copia, lo que dificulta la identificación de las fuentes de alimentación puesto que se trabaja con cantidades muy pequeñas de ADN. Aun así, el primer estudio en el que se identificaron preferencias alimentarias en flebotomos utilizó el gen nuclear de la prepronociceptina (PNOC) (Haouas y col., 2007) y ha sido aplicado en estudios posteriores con buenos resultados (Jaouadi y col., 2013).
- Secuencias de ADN repetitivo: las técnicas basadas en secuencias de ADN de repetición en tándem de número variable (VNTR, *variable number tandem repeat*), entre las que se incluyen secuencias microsátélites y minisátélites, utilizadas en las pruebas de paternidad o en medicina forense, permiten la identificación de individuos dentro de una misma especie (Ellegren, 2000; Schlötterer, 2000). En el estudio de fuentes de alimentación en insectos hematófagos permitirían relacionar al insecto con un hospedador concreto (Michael y col., 2001; Scott y col., 2006).

Introducción

Estas dianas moleculares son utilizadas con diferentes técnicas, la mayoría de ellas ligadas a la amplificación de ácidos nucleicos:

- Secuenciación: el fragmento amplificado mediante PCR se somete a un proceso de secuenciación que permite el posterior análisis de la secuencia y la búsqueda de homologías en bases de datos (Genbank®, EMBL, DDBJ, DNA Barcoding) (Jiménez y col., 2013; Maia y col., 2013; Baum y col., 2015; Bravo-Barriga y col., 2016a; González y col., 2017; Jaouadi y col., 2018).
- PCR-RFLP: la digestión con enzimas de restricción proporciona un patrón de bandas característico de cada secuencia, permitiendo su diferenciación. Sin embargo, presenta limitaciones como la necesidad de utilizar controles de las especies de vertebrados y la posible existencia de secuencias de diferentes especies con igual patrón tras la digestión con un enzima. Esto último puede solventarse utilizando un panel de diferentes enzimas de restricción (Maleki-Ravasan y col., 2009; Quaresma y col., 2012; Soares y col., 2014; González y col., 2015; Azizi y col., 2016; Fonteles y col., 2017).
- PCR *multiplex*: técnica en la que se utilizan varios cebadores en una misma reacción de amplificación. Se utilizan pares de cebadores específicos para un animal o grupo de animales y, aunque se trata de una técnica muy sensible, no permite identificar otras especies (Kent y Norris, 2005).
- qPCR: técnica muy sensible que permite conocer la cantidad de ADN inicial del vertebrado en la muestra, pero requiere del diseño de diferentes pares de cebadores y de la utilización de varias sondas para poder detectar las especies de vertebrados. Hasta el momento se ha aplicado en pocos trabajos con flebotomos (Sales y col., 2015; Rodrigues y col., 2017).
- Análisis de heterodúplex: se basa en la desnaturalización y renaturalización de las secuencias de ADN y la formación de cadenas dobles homólogas o heterólogas. Se utiliza para detectar mutaciones genéticas mezclando un mutante amplificado por PCR y ADN de tipo salvaje, seguido por la desnaturalización y reasociación. Los productos resultantes se separan mediante electroforesis en gel, con sustituciones de una sola base detectables bajo condiciones electroforéticas y formulaciones de gel óptimas. Su aplicación en la identificación de preferencias alimentarias precisa disponer de ADN de referencia y uno o varios ADNs conductores que permitan diferenciar posteriormente los heterodúplex formados en el gel (Lee y col., 2002).
- Alineación reversa *line-blot* (RLB, *reverse line blot*): esta técnica se combina con una reacción de PCR. Se utilizan sondas específicas de especie que se unen a membranas de nylon, para luego hacer hibridar los productos de PCR biotinilados, que se unen a su correspondiente sonda en la membrana. Esa unión es

posteriormente revelada por métodos colorimétricos. Se trata de una técnica muy sensible y específica, pero con la limitación de necesitar del diseño de una gran cantidad cebadores específicos y la posibilidad de que se den reacciones cruzadas (Abbasi y col., 2009).

- Análisis del perfil de ADN o huella genética mediante estudio de micro y minisatélites: es la única técnica lo suficientemente sensible como para determinar el individuo del que se ha alimentado el insecto (Inbar y col., 2016).
- MALDI-TOF MS: diferencia el origen de la sangre a partir del perfil obtenido tras el análisis de las proteínas presentes en la muestra, que se compara con un patrón control (Niare y col., 2016).
- Espectrometría de masas en tándem ligada a cromatografía líquida (LC-MS/MS, *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*): identificación de la fuente de alimentación mediante análisis de la secuencia peptídica de la hemoglobina, de la cual existe una amplia base de datos. Esta técnica permite identificar géneros de vertebrados e incluso especies (Keller y col., 2017).

Sin embargo, a pesar de la gran variedad de metodologías existentes para la identificación del origen de la sangre ingerida, en la práctica existen dificultades que imposibilitan en ocasiones esta identificación, como la presencia de sustancias inhibitoras, que el volumen de sangre no sea suficiente o que su grado de digestión esté avanzado (Velo y col., 2005). Así, la eficiencia en la determinación de la procedencia de la sangre presente en el tubo digestivo de las hembras de flebotomos varía desde porcentajes superiores al 90% (Bongiorno y col., 2003; Valinsky y col., 2014) a porcentajes cercanos al 20% (Maia y col., 2015). En numerosos estudios entomológicos llevados a cabo en diferentes países de la cuenca mediterránea se describen las preferencias alimentarias de las especies de flebotomos implicadas en la transmisión de la leishmaniosis en zonas endémicas o en brotes. En concreto, Valinsky y col., 2014 encuentran que la mayoría de hembras de *P. sergenti* capturadas con sangre en una región de Israel se habían alimentado sobre damanes, aunque una pequeña fracción se había alimentado sobre humanos. En Turquía han encontrado que la preferencia alimentaria de *P. tobbi* y *P. neglectus* son los humanos y los perros (Özbel y col., 2016; Karakuş y col., 2017). Por otro lado, estudios realizados en Grecia han determinado que los flebotomos implicados en focos de leishmaniosis presentaban un alto grado de antropofilia (Chaskopoulou y col., 2016), mientras que en Georgia más del 70% presentaban sangre de perro (Giorgobiani y col., 2012) y en Albania se encuentra una mayor variedad de fuentes de alimentación, detectando sangre de vaca, perro, gallina y humano (Velo y col., 2005). Estudios llevados a cabo en Marruecos, en los que se realizaron capturas dentro de los domicilios y en los alrededores de refugios de animales, detectan en unos casos un alto grado de antropofilia (Es-Sette y col., 2014), mientras que en los otros se identifica sangre de origen muy variado: humano, aves, roedores, conejo,

ganado vacuno (Ajaoud y col., 2015). También en Túnez, *P. perniciosus*, *Phlebotomus longicuspis* y *P. papatasi* presentaron un comportamiento oportunista, con una variada preferencia alimentaria (humano, ganado vacuno, ratón, cabra, dromedario, oveja o caballo); mientras que en *P. sergenti* sólo encontraron sangre de oveja o de caballo (Jaouadi y col., 2013). En Italia y Francia, diversos trabajos han obtenido resultados similares, describiendo en las diferentes especies de flebotomos capturadas preferencias por aquellos animales presentes en la zona en mayor número y más accesibles (Guy y col., 1984; Bongiorno y col., 2003; Rossi y col., 2008; Cotteaux-Lautard y col., 2016). En lo que concierne a España y Portugal, los diferentes estudios entomológicos muestran que *P. perniciosus* y *P. ariasi* presentan, al igual que en otros países europeos, un comportamiento oportunista, alimentándose sobre una amplia gama de vertebrados (Colmenares y col., 1995; Branco y col., 2013; Jiménez y col., 2013; Maia y col., 2013, 2015; Bravo-Barriga y col., 2016a). Además, en ambos países se ha detectado sangre humana en hembras de *S. minuta*, especie de flebotomo que tradicionalmente muestra preferencia por reptiles y anfibios, lo que, junto con la detección de *Leishmania* spp. en algunos ejemplares, ha dado lugar al estudio de su posible implicación en la transmisión del parásito a humanos (Maia y col., 2015; Bravo-Barriga y col., 2016b; González y col., 2016a; Maia y Depaquit, 2016).

1.5. Situación de la leishmaniosis en España

En España la leishmaniosis es una enfermedad fundamentalmente zoonótica, con el perro como principal reservorio. Está causada por una sola especie, *L. infantum*, que causa tanto formas cutáneas como viscerales de la enfermedad. Se distribuye en la mayor parte del territorio peninsular y en las Islas Baleares, aunque la mayor carga de la enfermedad se concentra en la región mediterránea, en el centro y sur peninsular. El ciclo de transmisión se ha establecido mayoritariamente en zonas urbanas y periurbanas más que en zonas rurales debido a los cambios poblacionales y a las modificaciones ambientales ligadas al modelo de crecimiento urbanístico.

La leishmaniosis en España sigue tres patrones de presentación: 1) endémico, en el que los casos de enfermedad se presentan de forma esporádica y el perro actúa como principal reservorio; 2) casos asociados a la coinfección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o a situaciones de inmunodepresión y 3) brotes epidémicos. La tasa de hospitalización debido a la leishmaniosis en nuestro país es de 0,41/100.000 habitantes, correspondiendo la mayoría de los casos de personas inmunocompetentes a niños menores de 5 años (Gil-Prieto y col., 2011), mientras que la incidencia nacional media por año notificada hasta el 2011 era de 0,45 casos/100.000 habitantes (Suárez-Rodríguez y col., 2012). Por otro lado, debido al aumento de casos de personas afectadas por el VIH y la consecuente inmunosupresión debido al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), tuvo lugar una reemergencia de la leishmaniosis entre 1986 y 1996, como consecuencia de la coinfección con *L. infantum*, llegando a reportarse 835 casos hasta

1998 (Alvar y col., 1997; OMS, 2010). En los pacientes coinfectados, la leishmaniosis tiende a cronificarse y no se llega a eliminar el parásito a pesar del tratamiento, manteniendo al sujeto en el estado de portador asintomático en muchos de los casos (Molina y col., 1999, 2003). Además, en estos pacientes se han identificado zimodemas de *L. infantum* poco comunes e incluso nuevos zimodemas (Jiménez y col., 1995a, 1995b). A finales de los años noventa del siglo pasado, el número de casos de coinfección disminuyó paulatinamente gracias a la introducción de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) y su uso rutinario en el tratamiento del VIH. A pesar de ello, la infección por este virus sigue siendo un factor de riesgo importante en el desarrollo de la LV, ya que la terapia TARGA no alcanza a restituir plenamente la inmunidad de los pacientes por lo que, en caso de infectarse con el parásito, la posibilidad de desarrollar la enfermedad sigue siendo elevada. Actualmente, junto con la infección por VIH, existen otras condiciones de inmunosupresión que actúan como factores de riesgo para la LV, tales como los trasplantes de órgano sólido y los tratamientos biológicos inmunosupresores (Van Griensven y col., 2014).

En España, la leishmaniosis fue Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) a nivel nacional desde 1982 hasta 1996 y durante ese periodo se registraron 1.574 casos. Posteriormente, el RD 2210/1995 por el que se creó la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) siguió considerando a la leishmaniosis como una EDO, pero su notificación pasó a ser de ámbito regional, y dejó de notificarse en aquellas Comunidades Autónomas en las que la enfermedad no fuera considerada endémica. Para conocer el número de casos de leishmaniosis ocurridos en nuestro país a partir de entonces es preciso consultar registros como el Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD) del Sistema Nacional de Salud. Un estudio retrospectivo llevado a cabo entre los años 1997 y 2011 ha determinado que en este periodo tuvieron lugar 8.010 hospitalizaciones relacionadas con la leishmaniosis (Herrador y col., 2015). De este total de registros, 3.442 presentaban leishmaniosis como primer diagnóstico. La mayor parte de los casos notificados al CBMD corresponden a formas viscerales de la enfermedad (82.6%), ya que requiere hospitalización para su tratamiento, mientras que las formas cutáneas se atienden y tratan principalmente de forma ambulatoria. Aún así, se estima que existe una subdeclaración del 25%-40% para la LV, y de casi el 100% para los casos de LC (Amela y col., 2012). A raíz del aumento de casos y brotes de los últimos años, junto con la actualización de datos sobre la incidencia, extensión y distribución real de la enfermedad, la leishmaniosis fue nuevamente incluida como EDO en todas las Comunidades Autónomas (RENAVE, 2013; Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad, 2015). En relación a la distribución de las hospitalizaciones debidas a la leishmaniosis, la CM presenta la mayor tasa (10,3 hospitalizaciones/1 millón de habitantes), seguida de las Islas Baleares (7,2/1 millón de habitantes), Valencia (7,4/1 millón de habitantes), Aragón (6,8/1 millón de habitantes) y Castilla-La Mancha (6,4/1 millón de habitantes) (Herrados y col., 2015). Por último, es importante resaltar que la mitad de los casos de LV descritos en viajeros europeos que visitan el sur de Europa son adquiridos en España (Ehehalt y col., 2014).

1.5.1. Reservorios de la leishmaniosis en España

Como ya se ha mencionado, el perro es el principal reservorio de la leishmaniosis en España, estando considerada la leishmaniosis canina como una patología endémica en casi todas las Comunidades Autónomas, incluidas las regiones del norte que hasta hace pocos años parecían no registrar un alto número de casos. Las investigaciones llevadas a cabo en los últimos años apuntan a un aumento del número de perros afectados por leishmaniosis en estas regiones (Miró y col., 2012). De esta manera, la seroprevalencia de *L. infantum* en perros en España varía de una región a otra, pasando del 6,4% en la región central al 46,6% en la región suroeste de la península (Miró y col., 2013); aunque estos datos de seroprevalencia deben ser tomados con cautela debido a que puede ser muy variable al depender de factores como la edad, sexo, lugar de residencia, entorno, o si se trata de mascotas, perros de caza, perros pastores, etc. (Muniesa y col., 2016). La sintomatología que pueden presentar los perros infectados va desde lesiones cutáneas a afecciones relacionadas con la visceralización del patógeno, como son la astenia, adelgazamiento, anemia no regenerativa o linfadenomegalia (Alvar y col., 2004; Miró y Molina, 2006). Tanto los perros con síntomas evidentes como aquellos asintomáticos pueden transmitir el parásito a los flebotomos, lo que a nivel epidemiológico complica el control de la enfermedad (Molina y col., 1994; Guarga y col., 2000; Courtenay y col., 2002; Michalsky y col., 2007; Laurenti y col., 2013).

Por otro lado, se ha estudiado el papel que podría jugar el gato en el ciclo doméstico de *L. infantum* en nuestro país y otras regiones de la cuenca mediterránea. En este sentido, diversos estudios muestran datos de seroprevalencia superiores al 10%, así como la presencia del parásito en tejidos de estos animales mediante detección por PCR (Martín-Sánchez y col., 2007; Solano-Gallego y col., 2007; Ayllón y col., 2008; Maia y col., 2008, 2014; Cardoso y col., 2010; Millán y col., 2011; Sherry y col., 2011; Chatzis y col., 2014; Miró y col., 2014; Paşa y col., 2015; Can y col., 2016; Montoya y col., 2018; Persichetti y col., 2018). Además se ha confirmado mediante experimentos de xenodiagnóstico directo que los flebotomos pueden adquirir el parásito al alimentarse sobre gatos infectados (Maroli y col., 2007). El papel de los animales de compañía en el ciclo de la leishmaniosis ha sido ampliamente estudiado, tanto por el riesgo de transmisión a humanos al compartir el mismo hábitat, como por la posibilidad de la dispersión de la enfermedad debido al desplazamiento de perros entre territorios y, en menor medida de gatos, tanto a nivel nacional como internacional (Trotz-Williams y Trees, 2003; Maia y Cardoso, 2015; Vrhovec y col., 2017). En relación a esto, estudios realizados en Reino Unido encontraron que el 71,20% de los perros con síntomas compatibles con leishmaniosis, posteriormente confirmada, habían viajado y permanecido más de 6 meses en España o habían sido adoptados de refugios localizados en nuestro país (Shaw y col., 2009).

Además, se ha investigado la presencia de *L. infantum* en otros animales con el fin de dilucidar su implicación en el ciclo del parásito en España fuera del ámbito doméstico. Así, se han encontrado cánidos silvestres infectados, como zorros o lobos (Marín-Iniesta

y col., 1982; Fisa y col., 1999; Criado-Fornelio y col., 2000; Sastre y col., 2008; Sobrino y col., 2008; Muñoz-Madrid y col., 2013; Del Río y col., 2014; Oleaga y col., 2015, 2018; Risueño y col., 2018). También se ha detectado el parásito mediante técnicas moleculares en felinos silvestres como el gato montés y el lince (Sobrino y col., 2008; Del Río y col., 2014; Risueño y col., 2018) y en otros animales silvestres como la gineta (Portús y col., 2002; Sobrino y col., 2008; Millán y col., 2011; Del Río y col., 2014; Risueño y col., 2018), el meloncillo (Sobrino y col., 2008), el visón europeo (Del Río y col., 2014), la garduña (Muñoz-Madrid y col., 2013; Del Río y col., 2014; Risueño y col., 2018), el tejón (Portús y col., 2002; Del Río y col., 2014), la marta (Portús y col., 2002; Millán y col., 2011; Del Río y col., 2014), la nutria (Oleaga y col., 2018), el erizo (Muñoz-Madrid y col., 2013), la musaraña gris (Millán, 2018); en roedores como el ratón de campo, el ratón común, ratón moruno o la rata (Fisa y col., 1999; Muñoz-Madrid y col., 2013; Navea-Pérez y col., 2015; Millán, 2018; Risueño y col., 2018). También se ha detectado *L. infantum* en animales de granja como caballos, ovejas y cabras (Portús y col., 2002; Solano-Gallego y col., 2003; Fernández-Bellón y col., 2006) y en animales de parques zoológicos y refugios, como chacales (Hervás y col., 1996), wallabies (Ramírez y col., 2013; Montoya, 2016) y orangutanes (Miró y col., 2018). La presencia del parásito en estos animales no implica necesariamente que estén involucrados en el mantenimiento del ciclo, pues para ello se deben cumplir otros factores, como se explica en el apartado 1.2.7.2.

Por último, investigaciones llevadas a cabo en la CM a raíz del brote detectado en el año 2010 llevaron al descubrimiento de nuevos reservorios implicados en el ciclo de *L. infantum*: la liebre y el conejo. Aunque las características del brote se explican en apartados posteriores, cabe señalar que los estudios realizados mostraron que los perros de la zona no estaban involucrados de manera determinante en el mantenimiento estable del brote (Miró y col., 2017), por lo que en la búsqueda de nuevos reservorios se encontró que las liebres y los conejos capturados en la zona eran capaces de transmitir el parásito a los flebotomos, como demostraron los experimentos de xenodiagnóstico directo llevados a cabo por Molina y col., 2012 y Jiménez y col., 2014. Así mismo, se encontraron altas tasas de infección en estos lepóridos (Moreno y col., 2014; Chicharro y col., 2017a) y se ha confirmado una elevada exposición a las picaduras de flebotomo determinada por la detección de anticuerpos antisaliva de *P. perniciosus* (Martín-Martín y col., 2014). Otros estudios llevados a cabo en diferentes regiones de España muestran que estos lagomorfos presentan una alta prevalencia de *L. infantum*, lo que demuestra el importante papel que podrían jugar estos animales en la dispersión y mantenimiento del ciclo del parásito en nuestro país (Ruiz-Fons y col., 2012; Díaz-Sáez y col., 2014; García y col., 2014; Risueño y col., 2018). También en otros países como Italia y Grecia se han encontrado liebres y conejos infectadas por *L. infantum* (Tsokana y col., 2016; Zanet y col., 2017; Rocchigiani y col., 2018).

1.5.2. Flebotomos presentes en España. Distribución.

En España se ha descrito la presencia de 13 especies de flebotomos (Figura 27), dos de las cuales son vectores probados de la leishmaniosis, *P. perniciosus* y *P. ariasi* (Rioux y col., 1986). Además, un estudio publicado recientemente parece involucrar como potencial vector a una tercera especie, *P. langeroni*, tras detectar mediante métodos

✧ <i>P. alexandri</i>	✧ <i>P. perniciosus</i>
✧ <i>P. ariasi</i>	✧ <i>P. sergenti</i>
✧ <i>P. chabaudi</i>	✧ <i>P. longicuspis</i>
✧ <i>P. fortunatarum</i>	✧ <i>P. riouxi</i>
✧ <i>P. langeroni</i>	✧ <i>S. fallax</i>
✧ <i>P. mascitti</i>	✧ <i>S. minuta</i>
✧ <i>P. papatasi</i>	

moleculares un alto porcentaje de ejemplares infectados por *L. infantum* (Sáez y col., 2018).

Figura 27. Especies de flebotomos citadas en España.

En la Figura 28 se muestra una cronología de la descripción de las diferentes especies de flebotomos presentes en España. La primera cita fue realizada en 1909 (Czerny y Strobl, 1909) y correspondía a un ejemplar de *P. papatasi* capturado en El Escorial. Sin embargo, tras una revisión taxonómica de los ejemplares capturados en aquella ocasión se demostró que este ejemplar pertenecía realmente a la especie *P. ariasi*, por lo que esta especie sería la primera cita en España de un flebotomo. En ese mismo trabajo, se identificaron ejemplares de *P. perniciosus* (León-Sanz y col., 1999, 1998).

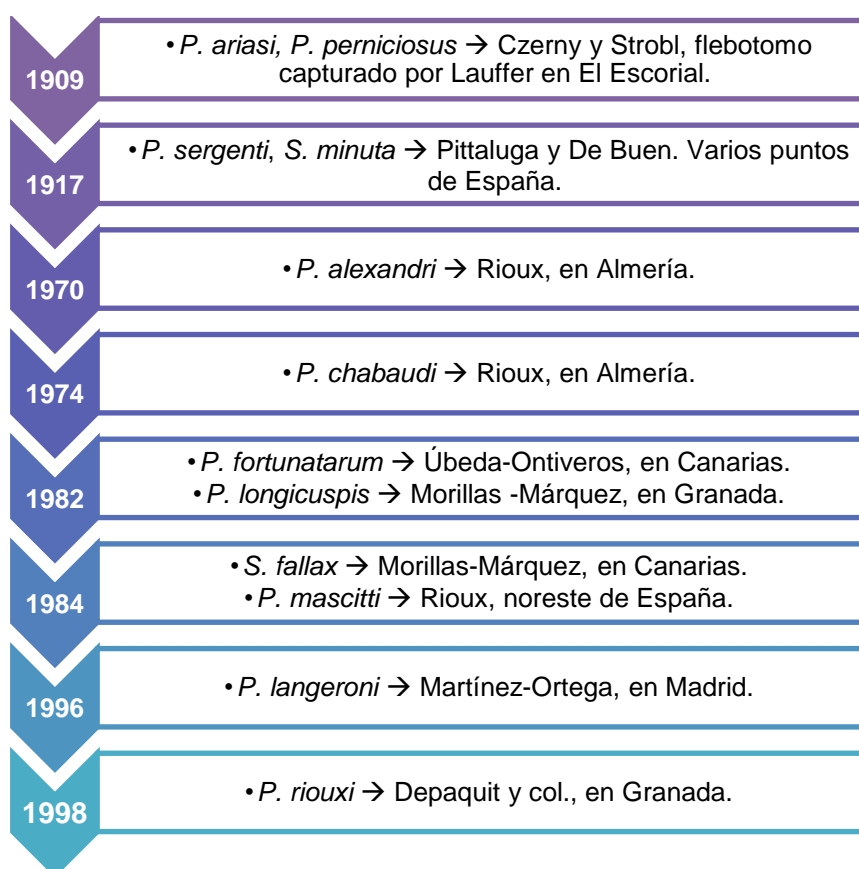


Figura 28. Cronología de la descripción de las diferentes especies de flebotomos en España considerando la revisión realizada por León-Sanz y col., 1998.

De las 13 especies mencionadas, existen discrepancias sobre dos de ellas, *P. longicuspis* y *Phlebotomus riouxi*. En el caso de *P. longicuspis*, citado en España en 1982 por Morillas-Márquez y col., se ha venido discutiendo si realmente está presente en España o si es una especie sinónima de *P. perniciosus* puesto que las características morfológicas en las que se basan sus diferencias, la terminación de las valvas peneanas de los machos y el engrosamiento de la parte basal del conductos espermático en hembras, parecen no ser evidentes (Morillas-Márquez y col., 1991). Tampoco los estudios moleculares mediante la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, *random amplified polymorphic DNA*) encuentran una solución a estas discrepancias (Martín-Sánchez y col., 2000). Otros estudios llevados a cabo en el norte de África han descrito la introgresión del gen *cytb* de *P. perniciosus* en ejemplares de *P. longicuspis* (Esseghir y col., 2000), además de llegar a diferenciar las dos especies mediante estudio isoenzimático (Benabdennbi et al., 1999), pudiendo confirmar la coexistencia de ambas especies de flebotomo en diferentes regiones de Marruecos (Pesson y col., 2004; Guernaoui y col., 2005; Benallal y col., 2017). En cuanto a *P. riouxi*, algunos estudios la consideran sinónima de *Phlebotomus chabaudi* al no encontrar suficientes evidencias, ni en su morfología ni mediante técnicas moleculares, para separarla como especie propia (Tabbabi y col., 2014). Otros estudios realizados en flebotomos capturados en Argelia y Túnez encuentran tanto diferencias morfológicas como a nivel genético que permiten separar las dos especies (Bounamous y col., 2008; Lehrter y col., 2017). Sin embargo, en España sigue sin esclarecerse definitivamente si los dos ejemplares de *P. riouxi* descritos en Granada (Depaquit y col., 1998) pertenecen a esta especie o a *P. chabaudi*.

En la Figura 29 se muestra una distribución de las diferentes especies de flebotomos presentes en España, según las revisiones de Gil-Collado y col., 1989 y Gállego-Berenguer y col., 1992, y actualizada con los datos de estudios recientes. Se puede observar que sólo en 6 provincias no existen datos sobre la presencia de estos dípteros (A Coruña, Asturias, Cantabria, Guipúzcoa, León y Vizcaya). En algunas comunidades la descripción de flebotomos es escasa, como por ejemplo en Galicia, donde tres estudios describen la presencia de flebotomos en las provincias de Lugo y Ourense (Nájera, 1944; Morillas-Márquez y Úbeda-Ontiveros, 1985; Miró y col., 2012). En la misma figura se señala también la presencia de *P. perniciosus* en la provincia de Pontevedra, a partir de capturas realizadas en 2016 y 2017 en la que se encontraron ejemplares de esta especie en dos municipios de la provincia (González, datos no publicados). La falta de información sobre las poblaciones de flebotomos en el norte del país es consecuencia de la escasez de estudios debido a la baja incidencia de la leishmaniosis en esta región del país, a pesar de que en investigaciones recientes se han detectado prevalencias significativas de la enfermedad en perros de Galicia (Amusategui y col., 2004; Miró y col., 2012, 2013). La actualización de la presencia de flebotomos, de su estacionalidad y el estudio de los factores que influyen en su distribución ha sido y es objeto de diversas investigaciones que están ayudando a comprender y aumentar el conocimiento sobre estos vectores en España (Aransay y col., 2004; Gálvez y col., 2010; Morillas-Márquez, 2010; Alcover y col., 2014; Ballart y col., 2014; Tello y col., 2015; Bravo-Barriga y col.,

2016a; Morillas-Márquez y col., 2017; González y col., 2017; Muñoz y col., 2017; Risueño y col., 2017).

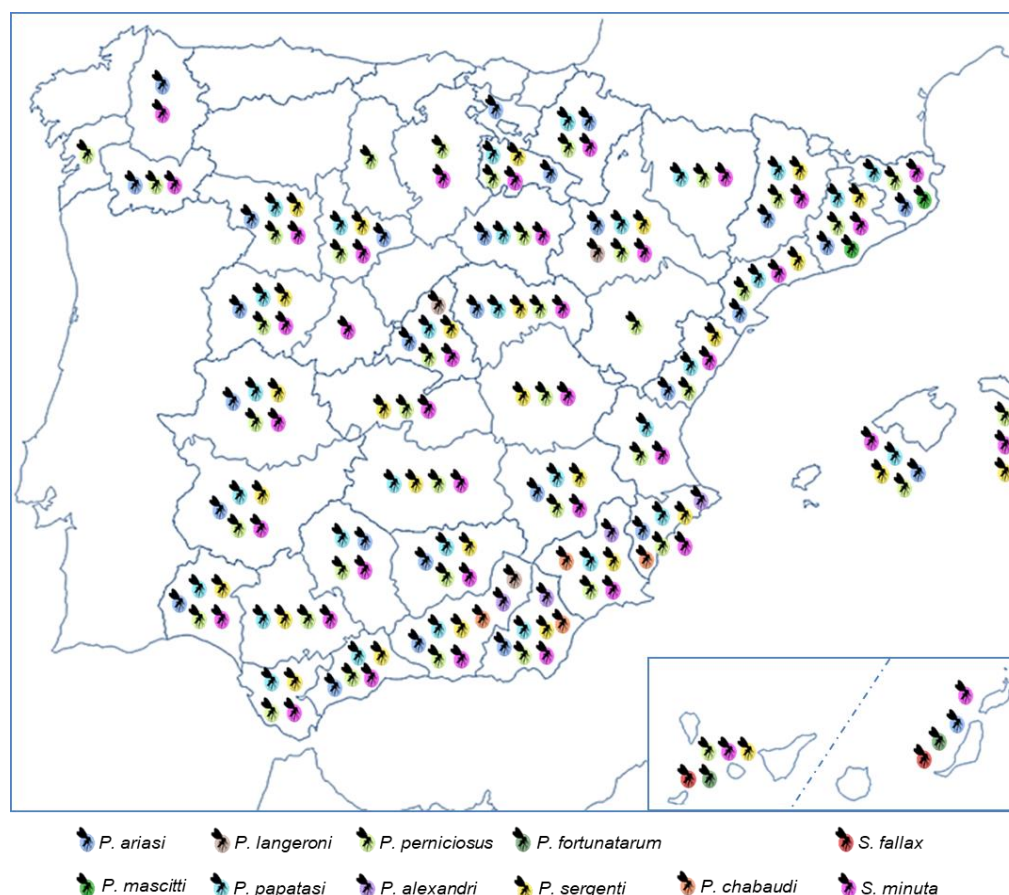


Figura 29. Distribución de las especies de flebotomos presentes en España (no se incluyen *P. longicuspis* ni *P. riouxi*). Fuente: modificado de Gil-Collado y col., 1989 y actualizado a partir de Barón-López, 2014; Bravo-Barriga y col., 2016a; Morillas-Márquez y col., 2017.

Como se puede observar en el mapa, la especie más abundante es *P. perniciosus*, pues esta especie se encuentra tanto a nivel del mar como en zonas de montaña (Gállego-Berenguer y col., 1992). También están ampliamente distribuidos *P. ariasi*, *P. papatasi*, *P. sergenti* y *S. minuta*. En cuanto a *P. ariasi*, es prevalente en zonas húmedas de montaña (Martínez-Ortega y Conesa-Gallego, 1987; Lucientes y col., 1991; Aransay y col., 2004; Gálvez y col., 2010), mientras que *P. papatasi* y *P. sergenti* se encuentran en zonas más áridas (Martínez-Ortega, 1985). Otras especies se encuentran en zonas muy concretas, como es el caso de *P. langeroni*, especie ligada a zonas secas y que solamente ha sido descrita en Madrid (Martínez-Ortega y col., 1996; Conesa-Gallego y col., 1999), en Zaragoza (Lucientes y col., 1994) y, recientemente, en Granada (Sáez y col., 2018). También se encuentra bastante restringida la distribución de *P. alexandri* y *P. chabaudi*, que se limita a algunas zonas del sureste de la Península, y la de *P. mascitti*, que se encuentra confinada en el noreste peninsular, lo que parece una continuación transpirenaica de su distribución (Gállego-Berenguer y col., 1992). Finalmente, *Sergentomyia fallax* y *Phlebotomus fortunatarum* sólo se encuentran en las Islas

Canarias, siendo esta última exclusiva de este archipiélago, no encontrándose en otra región del mundo (Úbeda-Ontiveros y col., 1982; Morillas-Márquez y Castillo-Remiro, 1984; Morillas-Márquez y col., 2017).

A continuación se detallan las características morfológicas utilizadas en la identificación taxonómica de las especies de flebotomos presentes en la Península Ibérica (revisado por Gil-Collado y col., 1989):

- *S. minuta*: las hembras presentan cibario armado y el cuerpo de la espermateca dilatado y con superficie lisa, sin distinguirse de los conductos, los cuales se estrechan hacia la base. Los machos de *S. minuta* presentan un estilo con cuatro espinas terminales. La valva peneana es más ancha en su base y con terminación redondeada.
- *Phlebotomus*: las hembras de las especies pertenecientes a este género presentan cibario inerme.
 - ★ Subgénero *Adlerius*:
 - *P. mascitti*: las espermatecas de las hembras de esta especie muestran conductos y cuerpo sin anillamiento. Los conductos se ensanchan en la región próxima al cuerpo de la espermateca y no presentan divertículos basales. La cabeza y el cuello están poco diferenciados. En los machos se observa un estilo con cinco espinas, dos de ellas terminales. El tufo del coxito carece de lóbulo basal y la valva peneana exhibe forma de sable.
 - ★ Subgénero *Larrossius*: los machos pertenecientes a las especies englobadas en este subgénero presentan el tufo del coxito sin lóbulo basal y el estilo con cinco espinas, dos de ellas terminales.
 - *P. ariasi*: las hembras presentan los conductos con una parte anillada hacia la cabeza de la espermateca y otra parte lisa hacia la base, la cual se encuentra dilatada. El cuello es corto y poco diferenciado. La valva peneana de los machos muestra dilatación apical en forma de badajo.
 - *P. perniciosus*: la espermateca de las hembras presenta divertículos basales piriformes con pared gruesa y situados en posición lateral a la base del conducto. Tanto los conductos como el cuerpo de la espermateca están anillados, y el cuello se diferencia con claridad. Los machos presentan una valva peneana con terminación apical bifurcada.
 - *P. langeroni*: en las hembras de esta especie no se observan divertículos basales y los conductos están anillados, finalizando en una dilatación fusiforme. El cuerpo de la espermateca también es anillado y el cuello está claramente diferenciado. Los machos de *P. langeroni* muestran una valva peneana con terminación en punta biselada asimétrica.

- ★ Subgénero *Paraphlebotomus*: los machos de las especies agrupadas en este subgénero presentan el estilo con cuatro espinas y el tufo del coxito se inserta en un lóbulo basal.
- *P. alexandri*: las hembras presentan armadura faríngea reticulada condensada en el primer cuarto basal. Los conductos y los cuerpos de las espermatecas son anillados y la cabeza se encuentra rodeada por el último anillo del cuerpo. En los machos, la genitalia externa presenta sólo una espina terminal en el estilo. La valva peneana presenta bordes casi paralelos y termina en punta curvada (forma de “proa de canoa”).
- *P. chabaudi*: en las hembras la armadura faríngea, de forma reticulada, se alarga hasta el primer tercio por los bordes. Los conductos y cuerpo de las espermatecas son anillados. El último anillo del reservorio está pedunculado y presenta forma de campana. Los machos presentan un estilo con dos espinas en posición terminal. La valva peneana presenta el extremo afilado, casi transparente.
- *P. sergenti*: la armadura faríngea, de forma también reticulada, presenta terminaciones apicales largas y sinuosas. Al igual que las dos especies anteriores, los conductos son anillados y no presentan divertículos basales. El cuerpo de la espermateca también es anillado, pero posee menor número de anillos que *P. alexandri* y *P. chabaudi*. El último anillo está engrosado y se encuentra rodeando a la cabeza. En los machos de esta especie el estilo es más corto que en las dos anteriores, y presenta sólo una de las cuatro espinas en posición terminal. La valva peneana termina en punta curvada, asemejándose al pico de un ave rapaz.
- ★ Subgénero *Phlebotomus*:
 - *P. papatasi*: la armadura faríngea forma escamas, que son denticuladas en la parte más apical. Los conductos, anillados, no presentan divertículos basales. El cuerpo, también anillado, presenta mayor número de anillos que las tres especies anteriores. Los anillos se estrechan hacia la parte apical y el último rodea la cabeza. Los machos presentan un estilo largo y delgado, con cinco espinas cortas, tres de las cuales se encuentran en posición apical. El tufo carece de lóbulo basal, insertándose directamente en el coxito. Esta especie presenta parámetros trirrámicos y valvas peneanas casi triangulares.

1.5.3. Situación de la leishmaniosis en la Comunidad de Madrid. Brote de leishmaniosis humana en la región suroeste de la Comunidad

Entre 1991 y 1996 se han confirmado 464 casos de leishmaniosis en la CM, constituyendo una incidencia media anual de 1,5 casos por 100.000 habitantes. El 59,3% de estos casos estaban asociados a inmunosupresión (SIDA) y el 43,5% presentaban antecedentes de usuario de drogas por vía parenteral (UDVP) (Ordobás y col., 2017). Entre 2000 y 2010, el número de casos anuales de leishmaniosis notificados en esta

Comunidad Autónoma se mantenía estable, pero en el último trimestre de 2010 se detectó un aumento en el número de casos, cuyo inicio parece remitirse a julio de 2009. Los estudios epidemiológicos revelan que estos casos se concentraban en la región suroeste de la Comunidad, constituyendo un brote de leishmaniosis en esta zona (Arce y col., 2013).

La incidencia media anual de casos asociados al brote en la región afectada ha sido 18,52 veces mayor que la de los casos esporádicos del resto de la CM, observándose una incidencia de 7,77 casos por 100.000 habitantes frente a los 0,42 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. Así mismo, los datos epidemiológicos establecen que en los menores de 2 años la incidencia media anual en el área del brote ha sido de 29,85 casos por 100.000 habitantes de casos, mientras que en el resto de la comunidad era de 1,10 por 100.000 habitantes (Ordobás y col., 2017).

Las investigaciones epidemiológicas indican que los casos se concentran en la zona suroeste, afectando principalmente a los residentes de Fuenlabrada y otros tres municipios colindantes, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid (BECM, 2012). El municipio más afectado es, sin duda, Fuenlabrada, donde se ha llegado a alcanzar una incidencia de 52,7 casos por 100.000 habitantes (Arce y col., 2013). Así, desde el inicio del brote hasta la actualidad, el 77,1% de los casos de leishmaniosis registrados en toda la CM se localizan en la región del brote (Figuras 30 y 31). Hasta la fecha se han notificado 737 casos, de los cuales un 38,2% se corresponden con formas viscerales y el 61,80% con formas cutáneas. La mediana de la edad es de 47 años (43 años en las viscerales y 50 en las cutáneas) y el rango de edad se situó entre los 2 meses y los 95 años. Otros datos recogidos por las encuestas epidemiológicas revelan que el 78,9% de

las personas afectadas son nacidas en España, no encontrándose factores de riesgo ambiental asociados a los casos (Arce y col., 2017).

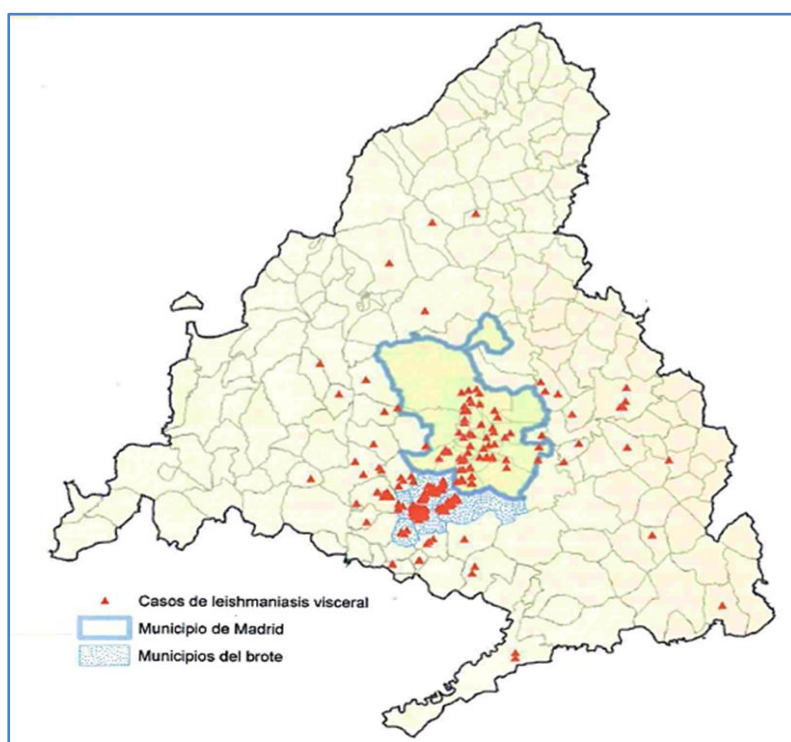


Figura 30. Distribución espacial de los casos de LV según la georreferenciación de sus domicilios en la CM, desde julio de 2009 hasta junio de 2014. Fuente: modificado de Ordobás y col., 2017.

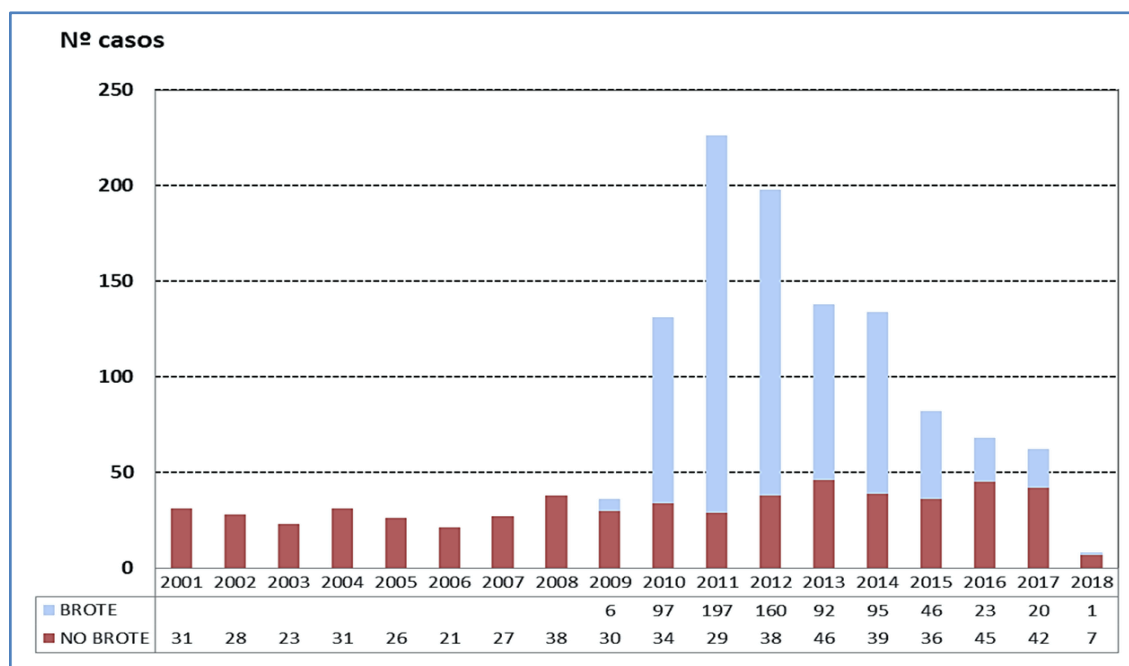


Figura 31. Comparación de la evolución del número de casos de leishmaniosis asociados al brote y los detectados en el resto de la CM, desde 2001 a abril de 2018. Fuente: RENAVE, EDO.

1.5.3.1. Distribución temporal de los casos

Como se muestra en la Figura 32, el máximo epidémico del brote se alcanzó en enero de 2011. En ese año se registró el mayor número de casos ($n=197$). A partir de entonces, el número de afectados ha ido descendiendo paulatinamente hasta la fecha, con alguna excepción. Cabe destacar la ausencia de casos de LV entre mayo y septiembre de 2013, volviendo a repuntar el número de casos hasta alcanzar los niveles de marzo de 2012 en los meses siguientes (Tabla 1) (Arce y col., 2017). En general, la curva epidemiológica muestra un aumento de casos entre octubre y marzo de cada año, debido al amplio periodo de tiempo que transcurre desde que el parásito es inoculado tras la picadura del flebotomo y la aparición de los síntomas de la enfermedad.

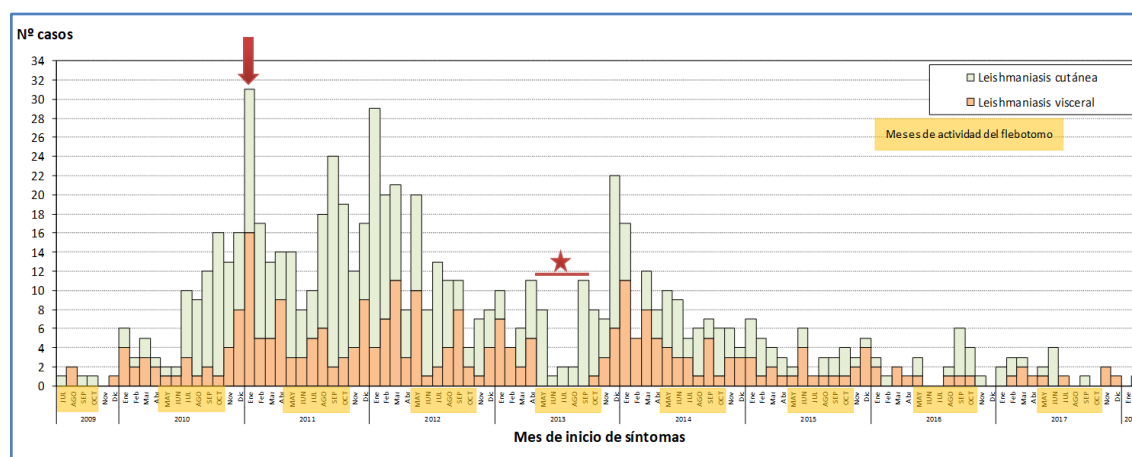


Figura 32. Curva epidemiológica según las formas de presentación y por mes de inicio de síntomas (actualizada a 05/04/2018). ↓ Mes con el mayor número de casos; ★ periodo en 2013 en el que no se registraron casos de LV. Fuente: RENAVE, EDO.

Tabla 1. Distribución de los casos según forma de presentación, por temporada epidemiológica de inicio de síntomas y municipio de residencia (actualizada a 05/04/2018). Fuente: RENAVE, EDO.

		TEMPORADA 1	TEMPORADA 2	TEMPORADA 3	TEMPORADA 4	TEMPORADA 5	TEMPORADA 6	TEMPORADA 7	TEMPORADA 8	TEMPORADA 9	TOTAL
		Julio 2009 a junio 2010	Julio 2010 a junio 2011	Julio 2011 a junio 2012	Julio 2012 a junio 2013	Julio 2013 a junio 2014	Julio 2014 a junio 2015	Julio 2015 a junio 2016	Julio 2016 a junio 2017	Julio 2017 a junio 2018	
FUENLABRADA	TOTAL	23	141	170	67	89	37	14	14	5	560
	Visceral	13	40	47	26	31	18	7	2	4	188
	Cutánea	10	101	123	41	58	19	7	12	1	372
HUMANES	TOTAL	0	3	3	4	1	1	2	0	0	14
	Visceral	0	0	2	2	0	0	0	0	0	4
	Cutánea	0	3	1	2	1	1	2	0	0	10
LEGANÉS	TOTAL	2	19	21	15	11	8	4	6	1	87
	Visceral	2	12	11	8	6	5	2	4	1	51
	Cutánea	0	7	10	7	5	3	2	2	0	36
GETAFE	TOTAL	2	10	12	12	9	15	10	6	0	76
	Visceral	1	8	5	5	7	5	7	2	0	40
	Cutánea	1	2	7	7	2	10	3	4	0	36
ZONA DEL BROTE	TOTAL	27	173	206	98	110	61	30	26	6	737
	Visceral	16	60	65	41	44	28	16	8	5	283
	Cutánea	11	113	141	57	66	33	14	18	1	454

1.5.3.2. Distribución espacial de los casos

El estudio de la distribución espacial de los casos en los municipios afectados por el brote muestra que la mayoría se concentran en la zona norte del casco urbano de Fuenlabrada, limítrofe con suelo no edificado y con el Parque Forestal de Bosquesur. En el resto de municipios no se ha detectado ningún patrón en la distribución de los casos, aunque sí se ha observado cierta agrupación en algunas áreas, como es el caso de Leganés y Getafe, donde el mayor número de casos se ha encontrado en las zonas más cercanas a los parques forestales de Bosquesur y Polvoranca (Figura 33). Así mismo, parece que las infraestructuras viarias existentes en la zona podrían haber sido decisivas en la distribución espacial de los casos asociados al brote, actuando como barreras físicas que aíslan los núcleos urbanos frente a la picadura de los flebotomos y, en consecuencia, de la exposición al patógeno. Por otro lado, se han propiciado vías de introducción del vector a otros núcleos o se han creado hábitats aptos para reservorios y vectores, como son los taludes del ferrocarril de cercanías, que atraviesa el parque, y de las autovías que circundan buena parte del mismo (Figura 33) (Arce y col., 2017).

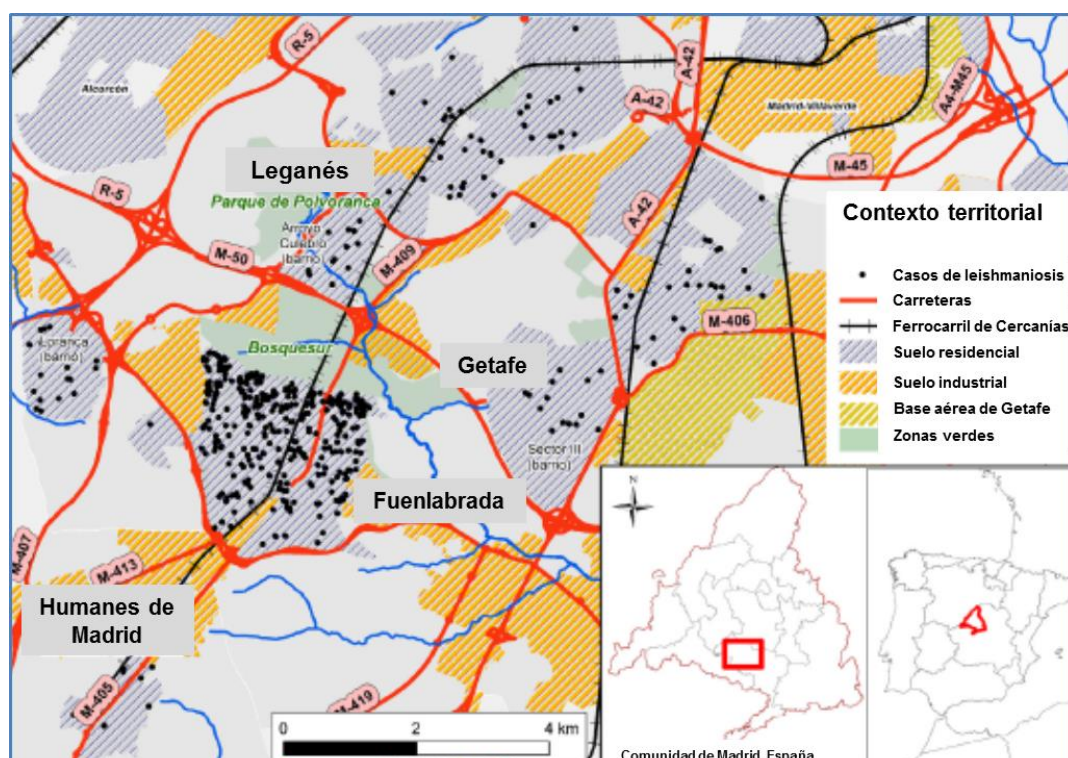


Figura 33. Distribución de casos y principales infraestructuras viarias presentes en la zona del brote. Fuente: modificado de Aránguez y col., 2014.

1.5.3.3. Demografía y características socioeconómicas de la zona

La región suroeste de la CM ha sufrido de manera especialmente intensa el proceso de densificación demográfica, cuyos inicios se remontan a finales de la década de 1960 (Figura 34). A partir de 1965, esta región del área metropolitana comenzó a recibir una parte muy importante de población procedente de otras provincias, así como población proveniente de la capital que se trasladaba al extrarradio debido a los precios más asequibles de las viviendas. De esta manera, en los últimos 30 años, el área sur metropolitana ha visto incrementada su población en un 103,9%, siendo la que ha presentado mayor crecimiento demográfico en la CM. Este hecho ha dado como resultado la creación de grandes ciudades dormitorio que han producido un cambio importante en el paisaje, pasando de un entorno eminentemente rural a uno claramente urbano (Pablos y col., 2017).



Figura 34. Municipio de Fuenlabrada. **A)** A mediados del siglo XX; **B)** en la actualidad. Fuente: página web “Memorias de Fuenlabrada” y página oficial del Ayuntamiento de Fuenlabrada (<http://memoriasfuenlabrada.blogspot.com/search/label/casco%20antiguo>; <http://www.ayto-fuenlabrada.es/index.do?MP=3&MS=31&MN=2&TR=C&IDR=84>).

Los cuatro municipios afectados por el brote de leishmaniosis (Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid) acogen una población total de 611.119 habitantes (a 1 de enero de 2017, INE), siendo Fuenlabrada y Leganés los más poblados, con 194.669 y 187.720 habitantes, respectivamente. Estos municipios presentaban vocación agrícola hasta mediados del siglo XX, evolucionando como polos de atracción industrial debido a los movimientos migratorios internos del país en las décadas de los 60 y 70, anteriormente mencionados. Aunque durante las últimas décadas del siglo pasado los municipios del sur metropolitano eran fundamentalmente industriales, en la actualidad predomina el sector servicios, tal como sucede en el resto de la CM (Pablos y col., 2017).

1.5.3.4. Descripción del área y cambios sufridos por el entorno

El área territorial afectada por el brote se encuentra a 15 km del centro del municipio de Madrid y cuenta con un amplio sistema de comunicaciones: carreteras estatales (A-42 y A-4), autonómicas (M-50, M-45, M-406, M-407 y M-506) y vías férreas (C-3, C-4, C-5 y AVE). Hasta finales de los años 90 del siglo pasado, el suelo estaba dedicado principalmente a la agricultura, sobre todo a cultivos de cereales de secano y huerta, persistiendo todavía pequeñas parcelas con estos usos. Con el desarrollo de la región, el uso del suelo ha ido cambiando, como ya se ha mencionado anteriormente, pasando a ser predominantemente residencial, industrial, dedicado a infraestructuras y a servicios. Así mismo, se trata de una región todavía en expansión y en proceso de urbanización de zonas rurales. Todos estos cambios han dejado un espacio con alta y creciente densidad de población, dotado de grandes infraestructuras viarias, con la creación en paralelo de parques y zonas verdes periurbanas que han tenido como consecuencia la modificación y degradación del entorno, la presencia de vertidos incontrolados, la alteración del cauce de los arroyos, el aislamiento y la fragmentación del espacio (Dirección General de Agricultura y Ganadería y Dirección General del Medio Ambiente. Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A., 2017; Pablos y col., 2017).

En la región afectada se ha proyectado y ejecutado la creación de dos parques forestales para el uso recreativo de la población de la zona. Se trata del Parque de Polvoranca y el

Parque Forestal de Bosquesur, ambos limítrofes a las zonas urbanizadas de los municipios afectados. Por un lado, el parque Polvoranca, diseñado en 1986, se considera la primera gran actuación de la CM en la región. Se ubica exclusivamente en el municipio de Leganés y su uso es recreativo, deportivo y educativo, disponiendo de un Centro de Educación Ambiental (CEA). Este parque presenta una extensión de 150 ha y surge en torno al arroyo de la Recomba, las lagunas de Mari Pascuala y de los Sisones, por lo que se trata de un ecosistema de humedales y pequeños cauces de agua que confluyen en el arroyo Culebro (Pablos y col., 2017).

En relación al Parque Forestal de Bosquesur (Figura 35), fue planeado a finales de los años noventa del siglo pasado, ejecutándose una pequeña parte del proyecto en el municipio de Getafe y el resto fue pospuesto hasta 2003. En 2005 el proyecto es incluido dentro del Plan de Repoblaciones de la Comunidad de Madrid 2006-2010 en el apartado Parques Forestales Periurbanos. La finalidad de este proyecto era crear un corredor verde entre los municipios del sur de la CM (Leganés, Fuenlabrada, Getafe y Pinto), y a su vez regenerar una amplia superficie que en esos momentos se encontraba degradada y abandonada. De esta manera, se regenerarían eriales, escombreras o cultivos abandonados, dando lugar a zonas de ocio para la población de esta región. Finalmente, se ha creado un parque con una superficie de 350 ha que se caracteriza por estar formado por 8 zonas discontinuas y diferenciadas que pertenecen a los municipios de Pinto, Getafe, Leganés y Fuenlabrada (Pablos y col., 2017).



Figura 35. Vista panorámica del Parque Forestal de Bosquesur en el que se puede apreciar la cercanía de las viviendas del municipio de Fuenlabrada al parque. Fuente: LEM (CNM-ISCIII).

1.5.3.5. Presencia de potenciales reservorios domésticos y silvestres

Dentro de los potenciales reservorios domésticos, el perro, reservorio clásico de la leishmaniosis en España, está presente de manera importante en el área del brote, tanto en los núcleos urbanos como en las explotaciones ganaderas existentes en la zona. Por otro lado, el otro animal doméstico presente en la zona es el gato, el cual se encuentra no sólo en el ámbito doméstico, sino también en colonias localizadas en zonas ajardinadas de las ciudades y en los parques del área afectada (Aránguez e Iriso, 2017). Sin embargo, los estudios de seroprevalencia y detección molecular de *L. infantum* en perros y gatos de la zona muestran que los niveles han permanecido estables y no han sufrido

un incremento tras la detección del brote, descartándose su implicación en el ciclo del parásito en la zona (Miró y col., 2014, 2017; Moreno y col., 2014; Chicharro y col., 2017a).

En cuanto a reservorios silvestres, existen un gran número de animales presentes en los parques forestales anteriormente mencionados, sin embargo destacan las liebres y conejos, que se encuentran en una elevada densidad de población. Tras la detección del brote, se han localizado y cartografiado alrededor de 6.000 vivares de conejos en los municipios afectados por el brote y áreas adyacentes. Estos vivares se han encontrado fundamentalmente en los taludes de los márgenes de las vías de comunicación (Figura 36A). Por otro lado, se han realizado registros de los avistamientos de liebres en toda la región (Figura 36B) (Aránguez e Iriso, 2017). Como se mencionó anteriormente, estos dos lagomorfos han resultado ser los principales reservorios de *L. infantum* en la zona, lo que se ha demostrado mediante estudios de xenodiagnóstico directo llevados a cabo tanto con liebres (Molina y col., 2012) como con conejos (Jiménez y col., 2014), en los cuales ejemplares de ambos lepóridos, seropositivos a *Leishmania* mediante la prueba inmunocromatográfica rK39 (Inbios International Inc.), fueron expuestos a flebotomos de una colonia mantenida en el LEM (CNM-ISCIH). Además, estudios de seroprevalencia realizados en la zona han mostrado un elevado porcentaje de conejos y de liebres expuestos a *L. infantum* (Moreno y col., 2014). Estos datos se han visto reforzados con trabajos de detección molecular en los que se ha identificado ADN de *L. infantum* en muestras de piel, bazo e hígado recogidas de conejos y liebres de la región (Chicharro y col., 2017a).

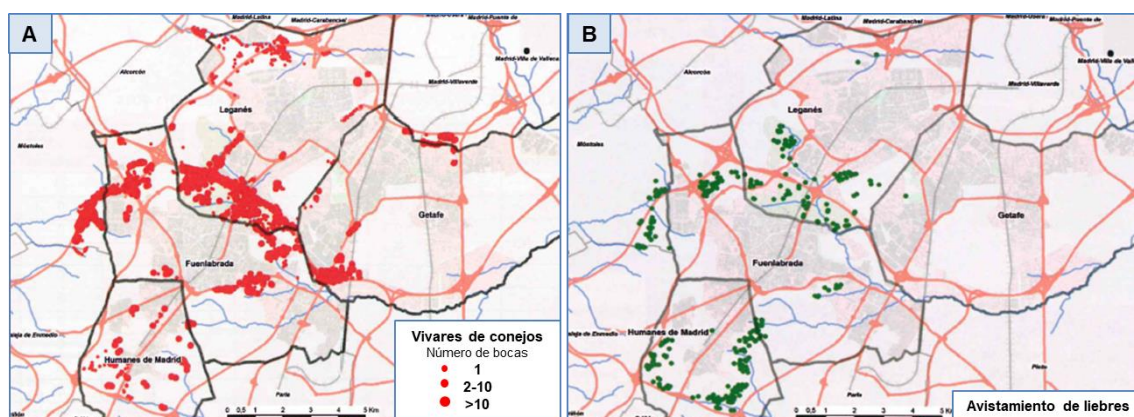


Figura 36. Presencia de conejos y liebres en el área afectada por el brote de leishmaniosis en el suroeste de la CM. **A)** Vivares de conejos registrados en la zona afectada por el brote de leishmaniosis; **B)** registro de avistamientos de liebres en la zona afectada por el brote de leishmaniosis. Fuente: modificado de Aránguez e Iriso, 2017.

1.5.3.6. Medidas de actuación

Desde la detección del brote en 2010 la Consejería de Sanidad, la Consejería de Medio Ambiente y los Ayuntamientos de los municipios afectados han llevado a cabo medidas de actuación en la región con el fin de controlar la transmisión del parásito. Para ello han

contado con el asesoramiento de expertos de diversos organismos como el ISCIII, las Facultades de Veterinaria y de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid y el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) (Arce y col., 2013).

Entre las actuaciones dirigidas a la reducción de la densidad del vector se encuentra la aplicación de productos insecticidas residuales dirigidos fundamentalmente a adultos. Para ello se aplicaron en potenciales puntos de cría, en el interior de los parques y en zonas colindantes con los núcleos de población. Se utilizaron dos tipos de insecticidas: piretroides de uso ambiental aplicados mediante nebulización (deltrametrina), con una periodicidad generalmente quincenal, realizando recorridos en el interior de los parques; y mediante rociamiento con cipermetrín con una periodicidad semanal, en el interior de registros de redes de alcantarillado, redes pluviales, imbornales y pasos de agua. Otras medidas se centraron en la modificación del hábitat con el fin de eliminar puntos que sirvieran de refugio al flebotomo, mediante el desbroce y limpieza de terrenos, la eliminación de escombreras, zonas de compostaje y almacenamiento de productos de poda, la limpieza y saneamiento de la red de alcantarillado y de las rejillas de recogida de aguas pluviales. Además, se han realizado actuaciones de control biológico, consistentes en la instalación de cajas anidaderas para fomentar la presencia de especies de aves insectívoras (herrerillo, carbonero, etc.) en los parques de Bosquesur y Polvoranca (Pablos y col., 2017).

Junto con las actuaciones directas dirigidas a disminuir la población de flebotomos en la zona, también se realizaron actuaciones frente a los reservorios, principales fuentes de alimentación para los flebotomos. Inicialmente, los organismos responsables de llevar a cabo las actuaciones centraron sus esfuerzos en estudiar el papel del perro en el brote, ya que se trata del reservorio clásico de la leishmaniosis en los países de la cuenca mediterránea. Por ello, se efectuaron campañas de detección de leishmaniosis canina en clínicas veterinarias aprovechando las campañas oficiales de vacunación antirrábica e identificación de animales de compañía. Con el fin de aumentar el radio de actuación también se localizaron otras concentraciones de perros, como rehalas o jaurías, en las que se ofreció la posibilidad de realizar test rápidos. Estas campañas se realizaron entre 2011-2013, resultando en una prevalencia de la leishmaniosis canina del 2%, similar e incluso inferior al promedio del resto de áreas de la CM. Al concluirse que liebres y conejos eran los reservorios implicados en el mantenimiento del ciclo silvestre en esta región se comenzaron a tomar medidas para el control de la población de estos lepóridos, realizando capturas masivas con el fin de disminuir su población. Las actuaciones frente a las liebres se realizaron mediante la colocación de redes verticales y con ojeadores especializados batiendo el terreno (Figura 37A), ya que estos lagomorfos no construyen madrigueras, sino que hacen camas en la superficie del terreno, refugiándose en zonas arbustivas. Una vez reducida y dispersada la población de liebres, se tomaron otras medidas como el uso de galgos, aves de cetrería e incluso armas de fuego en determinadas zonas autorizadas y con el correspondiente dispositivo de seguridad. Por otro lado, para la captura de conejos se usó el hurón y el capillo, la colocación de

sistemas de jaula-trampa tradicional (Figura 37B) y armas de fuego. Por último, también se destruyeron vivares de conejos, que además de servir para el control de la población de estos animales, permitió eliminar lugares de cría del flebotomo. Esta medida se ha concentrado en los meses que dura el periodo de cría del conejo (de febrero a octubre) y más exactamente coincidiendo con el periodo de máxima actividad del vector (de mayo a octubre) (Dirección General de Agricultura y Ganadería y Dirección General del Medio Ambiente. Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A., 2017).

Como también se ha mencionado anteriormente, perros y gatos no parecen estar jugando un papel importante en el mantenimiento del ciclo del parásito en esta región. Aun así, en el caso de los perros, se llevaron a cabo labores de información y asesoramiento en las explotaciones ganaderas para que se tomaran las medidas de control adecuadas. Así mismo, desde principios de 2012 se valoró el control de las colonias de gatos callejeros. Además, se adoptaron medidas para el control de animales abandonados (Arce y col., 2013).



Figura 37. Métodos de captura de lagomorfos. **A)** Redes para captura de liebres; **B)** jaula-trampa utilizada para la captura de conejos. Fuente: modificado de Dirección General de Agricultura y Ganadería y Dirección General del Medio Ambiente. Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A., 2017.

Por último, se han realizado campañas de información a la población en general, como el reparto de trípticos y carteles por los centros municipales, centros educativos, centros de salud y clínicas veterinarias (Figura 38), la publicación de artículos de prensa relativos a la protección de los ciudadanos ante los flebotomos en las revistas y webs municipales, o recomendaciones para el mantenimiento de zonas ajardinadas en comunidades de vecinos, administradores de fincas y empresas. También se han instalado carteles informativos a la entrada de los grandes parques urbanos con recomendaciones para la prevención y se ha informado a los Consejos Locales de Salud, que se reúnen periódicamente y en los que participan asociaciones de vecinos, de enfermos, de personas de la tercera edad, de mujeres, de inmigrantes; y a los hospitales del Área sanitaria, los partidos políticos y los sindicatos (Pablos y col., 2017).



Figura 38. Tríptico “La leishmaniasis, cómo protegerte” publicado por la CM, el Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid (COLVEMA) y los ayuntamientos de Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid. Fuente: página web del COLVEMA (<https://www.colvema.org/pdf/folleto/Folleto-Leishmaniosis-2012.pdf>).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Desde 2010 se viene declarando un aumento inusual de casos de leishmaniosis humana en la región suroeste de la CM, constituyendo un brote que aún no se considera concluido. La zona afectada se trata de un área urbana colindante a una gran zona verde de reciente creación, por lo que la singularidad del brote es mayor ya que no se había descrito una situación similar ni en España, ni en Europa. Por tal motivo, se estimó necesaria la realización de un estudio exhaustivo del ciclo biológico de *L. infantum* en la zona del brote, prestando especial atención a los aspectos entomológicos de la transmisión. Así, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido el estudio de las poblaciones y de los aspectos biológicos que relacionan al parásito y a los flebotomos presentes en la zona del brote. Para ello se diseñaron muestreos intensivos en el área afectada por el brote que se llevaron a cabo entre los meses de junio y octubre de 2012, 2013 y 2014.

Para el desarrollo del objetivo general planteado, se establecieron los siguientes objetivos concretos:

- ✦ Estudio de la abundancia, distribución y dinámica estacional de las especies de flebotomos presentes en el área de estudio.
- ✦ Aislamiento de promastigotes a partir de flebotomos capturados en la zona de estudio y establecimiento de las tasas de infección por *L. infantum*.
- ✦ Caracterización molecular de los aislados obtenidos.
- ✦ Detección de ADN de *L. infantum* y de otros posibles tripanosomátidos en flebotomos mediante métodos moleculares.
- ✦ Determinación de la carga parasitaria mediante qPCR en flebotomos infectados por *L. infantum*.
- ✦ Estudio de las preferencias alimentarias en las hembras de flebotomo que contenían sangre en su tubo digestivo en el momento de su captura.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Descripción del área del estudio entomológico

El área en donde se llevaron a cabo los estudios entomológicos se localiza en dos parques forestales de carácter periurbano situados en el suroeste de la CM y que se encuentran rodeados por los municipios afectados por el brote de leishmaniosis detectado en el año 2010. En primer lugar, el Parque Forestal de Bosquesur que con una superficie de 323 ha, se encuentra ubicado entre cuatro municipios: Fuenlabrada, Getafe, Leganés y Pinto. En segundo lugar, el Parque Forestal de Polvoranca, de menor tamaño que el anterior (150 ha), ubicado exclusivamente en el municipio de Leganés, aunque es colindante con Alcorcón y Fuenlabrada (Consejería de Medio Ambiente Administración Local y Ordenación del Territorio, 2018). La población total de los cuatro municipios en los que se encuentra el Parque de Bosquesur es de 611.119 habitantes (a 1 de enero de 2017), siendo Fuenlabrada y Leganés los más poblados, con 194.669 y 187.720 habitantes, respectivamente (INE, 2018).

Ambas áreas han sufrido cambios drásticos en un periodo corto de tiempo pues el uso tradicional del suelo era agrícola, fundamentalmente cultivos de secano. Las dos zonas se han repoblado con diversas especies arbóreas como encinas, sauces, chopos, alisos, fresnos, pinos; y arbustos tales como romero, espliego, salvia, espino albar y retama (Consejería de Medio Ambiente Administración Local y Ordenación del Territorio, 2018). En cuanto a la fauna presente en el área estudiada, no hay registros previos al comienzo de la construcción del parque, pero sus características de suelo agrícola para cultivo de secano harían de la zona un hábitat idóneo para mamíferos como el conejo, la liebre, la rata común, el ratón común, el ratón de campo, el topillo mediterráneo, el topo, el erizo común y el murciélago enano (Purroy Irazoz y Varela, 2003). En cuanto a la población de aves, existen tanto aves propias de zonas de cultivo como urbanas y aves ligadas a medios acuáticos. Entre las especies de los dos primeros grupos se encuentran el gorrión común, el jilguero, la urraca, la golondrina común y la collalba gris. En cuanto a las aves propias de sistemas acuáticos, se encuentran el ánade real, la lavandera blanca, el mirlo común, el cisne y la oca (Rodríguez Rodríguez, 2010).

El área de realización de los estudios entomológicos se incluye dentro del piso bioclimático mesomediterráneo, con fuertes contrastes entre veranos, con clima muy seco y altas temperaturas, e inviernos, muy fríos y secos (Consejería de Medio Ambiente Administración Local y Ordenación del Territorio, 2007). Según los datos registrados en la estación meteorológica más cercana, situada en el municipio de Getafe, la temperatura media anual de la región se sitúa en torno a los 15°C y una precipitación media anual de 365 mm, presentando un ombrotipo de tipo seco (AEMET, 2018). El rango altitudinal de la zona es muy uniforme, oscilando entre los 655 m y los 691 m.

El suelo de esta región está formado por arenas y arcillas (Rodríguez-Rodríguez, 2010). Además, existe una gran laguna artificial ubicada en el Parque de Polvoranca que

constituye el ecosistema acuático más importante de la zona junto con el arroyo Culebro, afluente del Manzanares (Consejería de Medio Ambiente Administración Local y Ordenación del Territorio, 2007).

En la zona se han ido construyendo diversas infraestructuras como autovías y vías de ferrocarril que, a lo largo de los años, han modificado el entorno tradicionalmente agrario, y han dado lugar a la aparición de barreras físicas para la fauna de la zona, así como abundantes taludes, que constituyen espacios idóneos para las madrigueras de conejos (Figura 39).

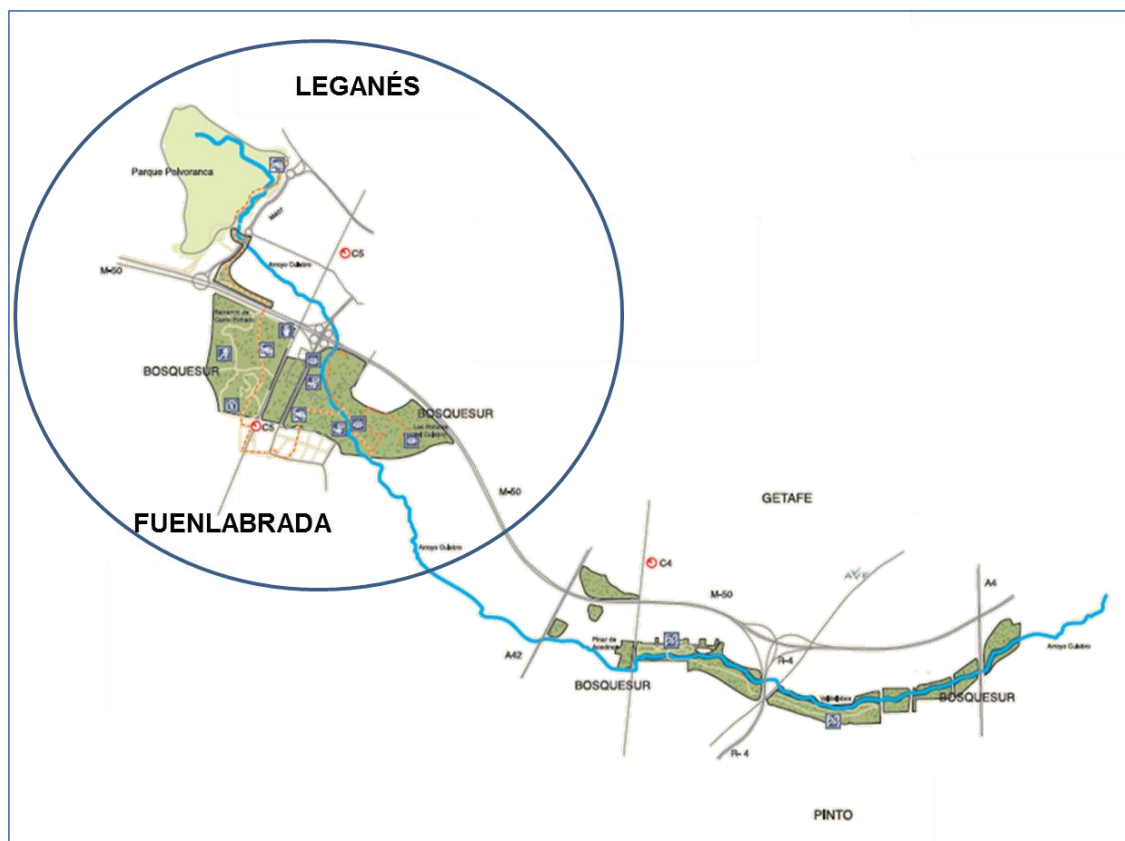


Figura 39. Plano del proyecto del Parque Forestal de Bosquesur donde se muestran las diferentes infraestructuras viarias de la zona. Fuente: página web de la CM (<http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheaderna me1=Content-Disposition&blobheadervalue1=filename%3DBosquesur.pdf>).

3.2. Estudio entomológico

3.2.1. Estaciones de muestreo

Los muestreos entomológicos se llevaron a cabo mensualmente desde junio a octubre, coincidiendo con el periodo de actividad de los flebotomos, durante los años 2012, 2013 y 2014. Los muestreos se realizaron en cuatro estaciones distribuidas en dos municipios: Fuenlabrada, donde se ubicaron tres estaciones (ATE, BOS y JIC) y Leganés, con una estación de muestreo (POL) (Figura 40). En cada estación se colocaron mensualmente

dos trampas de luz tipo CDC en sendos puntos de muestreo, cuya geolocalización y altitud se muestra en la Tabla 2. Al mismo tiempo, en cada una de las estaciones de muestreo se colocaron 20 trampas adhesivas.

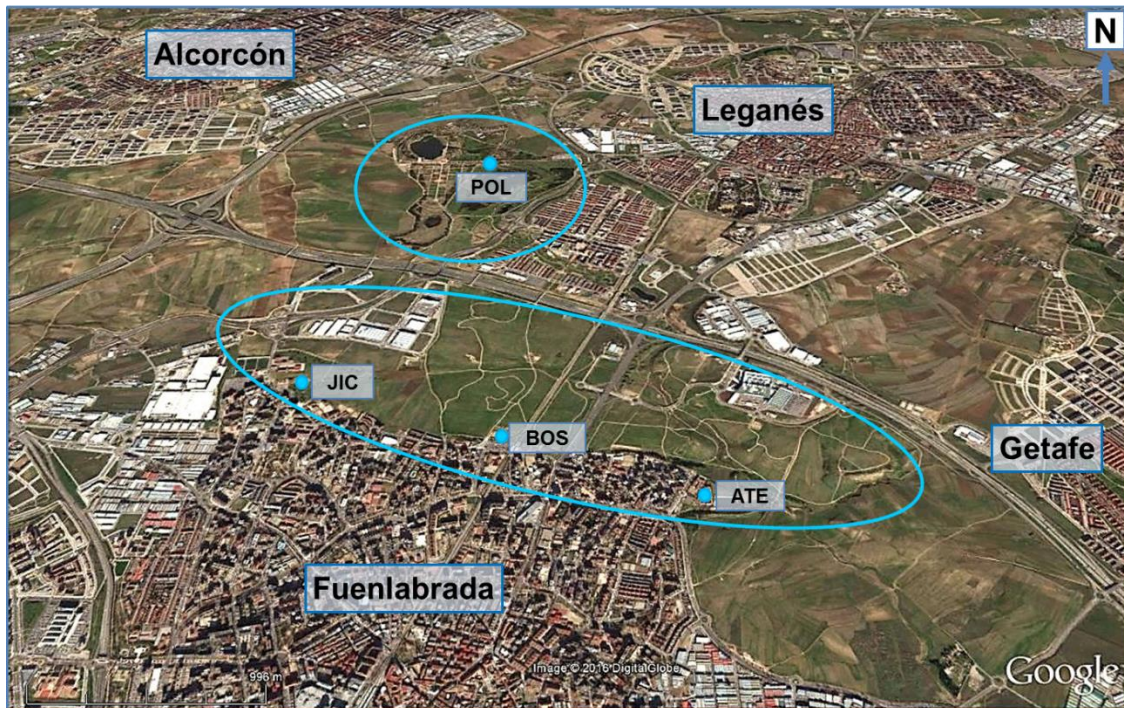


Figura 40. Mapa de la zona donde se ha llevado a cabo el estudio entomológico y localización de las estaciones de muestreo. Fuente: modificada de Google Maps.

Las estaciones de muestreo ATE y JIC se localizan en centros educativos, concretamente en el Instituto de Enseñanza Superior (IES) José Luis López Aranguren, anteriormente denominado IES Atenea, y en el Centro de Educación Especial (CEE) Sor Juana Inés de la Cruz, respectivamente. El IES Atenea se ubica al noreste del municipio de Fuenlabrada, junto a una instalación deportiva municipal. Por otro lado, el CEE Sor Juana Inés de la Cruz está ubicado al noroeste del municipio, junto a una amplia zona residencial, la urbanización El Naranjo, límite con el Parque Forestal de Bosquesur. Las otras dos estaciones, BOS y POL, se localizan en sendos ^o de la CM. La estación BOS se ubica en la parte norte de Fuenlabrada, dentro del Parque Forestal de Bosquesur, junto a la estación de cercanías de La Serna. La estación POL se sitúa dentro del Parque Forestal Polvoranca, localizado en la zona suroeste del municipio de Leganés y limita al sur con el municipio de Fuenlabrada. Ambos CEA poseen huertos, zonas de compostaje, de almacenamiento de aperos de labranza y un pabellón donde se llevan a cabo actividades educativas.

Tabla 2. Georreferenciación y altitud de cada punto de muestreo.

ESTACIÓN MUESTREO	CÓDIGO	ALTITUD (metros)	GEORREFERENCIACIÓN
ATE	ATE1	657	40° 17' 38.79" N 3° 46' 49.67" O
	ATE2	655	40° 17' 34.23" N 3° 46' 49.93" O
BOS	BOS1	659	40° 17' 53.63" N 3° 47' 34.44" O
	BOS2	660	40° 17' 52.67" N 3° 47' 35.47" O
JIC	JIC1	691	40° 18' 0.27" N 3° 48' 23.27" O
	JIC2	688	40° 18' 2.10" N 3° 48' 22.05" O
POL	POL1	679	40° 19' 29.79" N 3° 47' 46.87" O
	POL2	679	40° 19' 29.10" N 3° 47' 45.99" O

Los datos de temperatura y humedad relativa se registraron cada diez minutos mediante *data loggers* (Velleman® DVM171HD) (Figura 41) colocados en cada una de las trampas CDC (Figura 50B), haciendo un total de 8 registros en cada mes de muestreo. Para el estudio fenológico se utilizaron los datos de salida y puesta de sol de cada día de muestreo según los registros del Instituto Geográfico Nacional (Tabla 3) (Instituto Geográfico Nacional, 2018), coincidiendo con el periodo de actividad diario de los flebotomos.



Figura 41. *Data logger* utilizado para el registro de la temperatura y humedad relativa en cada punto de muestreo. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).

Tabla 3. Horarios de la puesta de sol y del amanecer durante los días de muestreo.

Año									
2012				2013			2014		
Mes	Día			Día			Día		
JUNIO	20	6:45	21:48	19	6:44	21:48	11	6:44	21:45
	21	6:45	21:48	20	6:45	21:48	12	6:44	21:45
	22	6:45	21:49	21	6:45	21:48	13	6:44	21:46
JULIO	16	6:58	21:43	15	6:57	21:44	16	6:58	21:43
	17	6:59	21:42	16	6:58	21:43	17	6:59	21:43
	18	7:00	21:45	17	6:59	21:42	18	7:00	21:42
AGOSTO	21	7:32	21:03	12	7:23	21:16	19	7:29	21:07
	22	7:33	21:02	13	7:24	21:15	20	7:30	21:05
	23	7:34	21:00	14	7:25	21:13	21	7:31	21:04
SEPTIEMBRE	18	7:59	20:18	16	7:56	20:22	8	7:49	20:36
	19	8:00	20:16	17	7:57	20:20	9	7:50	20:34
	20	8:01	20:15	18	7:58	20:19	10	7:50	20:32
OCTUBRE	15	8:26	19:34	15	8:26	19:35	7	8:17	19:48
	16	8:27	19:33	16	8:27	19:33	8	8:18	19:46
	17	8:28	19:31	17	8:28	19:32	9	8:19	19:44

3.2.2. Métodos de muestreo

3.2.2.1. Trampas adhesivas

Para la preparación de las trampas adhesivas utilizadas en los estudios entomológicos se utilizaron hojas de papel blanco de un tamaño de 20x20 cm marcadas con el sello del ISCIII para su identificación. Las hojas se impregnaron con aceite de ricino (Panreac®), manteniéndolas en un recipiente hasta el momento de su colocación, en el que se retiraba el exceso de aceite (Figura 42A). Los flebotomos quedan retenidos en el papel gracias a la alta capacidad adhesiva proporcionada por el aceite. Puesto que se trata de trampas de interceptación, estas fueron colocadas en potenciales lugares de reposo o paso de los flebotomos, como por ejemplo tubos de desagüe, grietas del suelo, tajeas o leñeras, etc. Para la colocación de algunas de las trampas se utilizó una varilla de madera que era clavada en el suelo. En otros casos, las trampas simplemente eran situadas sobre rejillas o enrolladas y colocadas en zonas con escombros y restos de madera (Figuras 43-46). Las trampas se dejaron a lo largo de dos noches consecutivas, siendo recogidas y almacenadas individualmente entre hojas de papel (tamaño DIN A3) plegadas por la mitad (Figura 42B), para ser procesadas posteriormente en el laboratorio. Las trampas fueron numeradas correlativamente a lo largo de los tres años de muestreo para la correcta recogida y archivo de los datos.

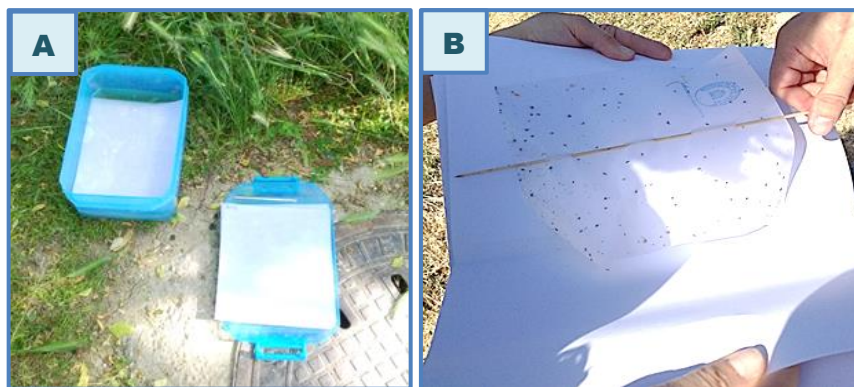


Figura 42. Muestreo con trampas adhesivas. **A)** Recipiente de plástico donde se conservan las hojas de papel impregnadas con aceite de ricino hasta su colocación. **B)** Momento de recogida y almacenamiento de una trampa adhesiva para su conservación y transporte al laboratorio. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).

Las trampas adhesivas permiten determinar la densidad de flebotomos capturados mediante el cálculo del número de flebotomos por m^2 de superficie muestreada (flebotomos/ m^2). Para el cálculo de la superficie se ha de tener en cuenta que cada cara de una trampa tiene una superficie de 400 cm^2 , y que los flebotomos pueden quedarse adheridos por ambas caras, por lo que la superficie total de captura por trampa es de 800 cm^2 , lo que equivale a 0.08 m^2 .



Figura 43. Colocación de las trampas adhesivas en la estación ATE junto a los muros del recinto, en zonas de vegetación **(A)** y con restos de madera y escombros **(B)**. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).



Figura 44. En la estación BOS las trampas se situaron en rejas que cubren los aparatos de aire acondicionado (A), taludes con vegetación y madrigueras de conejos (B), rejillas de alcantarillado (C) y tajeas (D). Fuente: LEM (CNM, ISCIII).



Figura 45. Localización de las trampas adhesivas en la estación JIC. A) Junto a una caseta de ladrillo. B) A lo largo del muro colindante al Parque Forestal de Bosquesur. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).



Figura 46. Ubicación de las trampas adhesivas en la estación POL: **A)** zonas con vegetación; **B)** en composteras; **C) y D)** alrededor de una caseta junto a la que se almacenaban restos de madera. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).

Cada trampa fue procesada de manera individual, despegando los flebotomos adheridos al papel con ayuda de un pincel humedecido en etanol de 96° para poder disolver el aceite de ricino (Figura 47A). Los flebotomos de cada trampa fueron almacenados en un tubo con etanol de 96°, rotulado con el número identificativo de la trampa, donde permanecieron durante 72 h con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de aceite de ricino. A continuación, se realizó el recuento de hembras, con y sin sangre, y de machos, almacenándose por separado en tubos con etanol de 70° que fueron conservados a 4°C hasta su procesamiento. Las hembras con sangre en el abdomen se conservaron para posteriores análisis moleculares mientras que las hembras restantes fueron aclaradas en medio de Marc-André durante 24 h a 37°C y montadas en medio de Hoyer (Figura 47B) para su posterior clasificación con la ayuda de un microscopio de contraste de fases. Los machos fueron montados directamente en medio de Hoyer y clasificados taxonómicamente con ayuda de un microscopio.

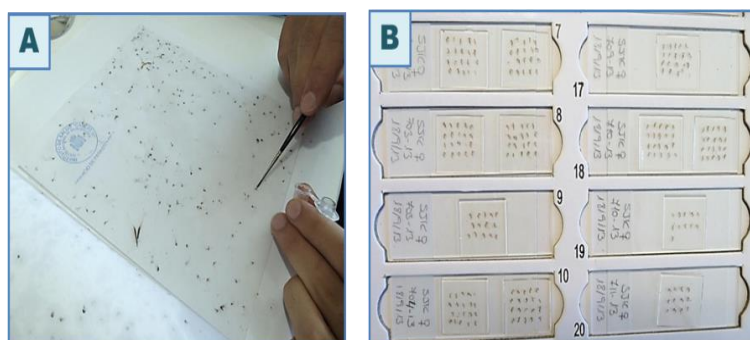


Figura 47. Procesamiento de los ejemplares capturados con las trampas adhesivas. **A)** Manipulación de una trampa adhesiva para retirar con un pincel los flebotomos adheridos al papel; **B)** preparaciones de hembras de flebotomo montadas en medio de Hoyer. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).

La clasificación taxonómica de los ejemplares se realizó utilizando las claves pictográficas que se muestran en las Figuras 48 y 49. Para la identificación taxonómica de las hembras de los flebotomos, los caracteres principales utilizados fueron la presencia o ausencia de cibario armado en su faringe, el aspecto de la armadura faríngea y la morfología de los conductos, cuerpo y cabeza de la espermateca, así como la forma de los divertículos basales (ver Figura 12). En el caso de los machos de flebotomo, los caracteres principales que se utilizaron para su identificación taxonómica fueron la morfología de la valva peneana, la forma del estilo, el número y disposición de las espinas en el estilo, el lugar de inserción del tufo del coxito y la forma del parámetro (ver Figura 13).

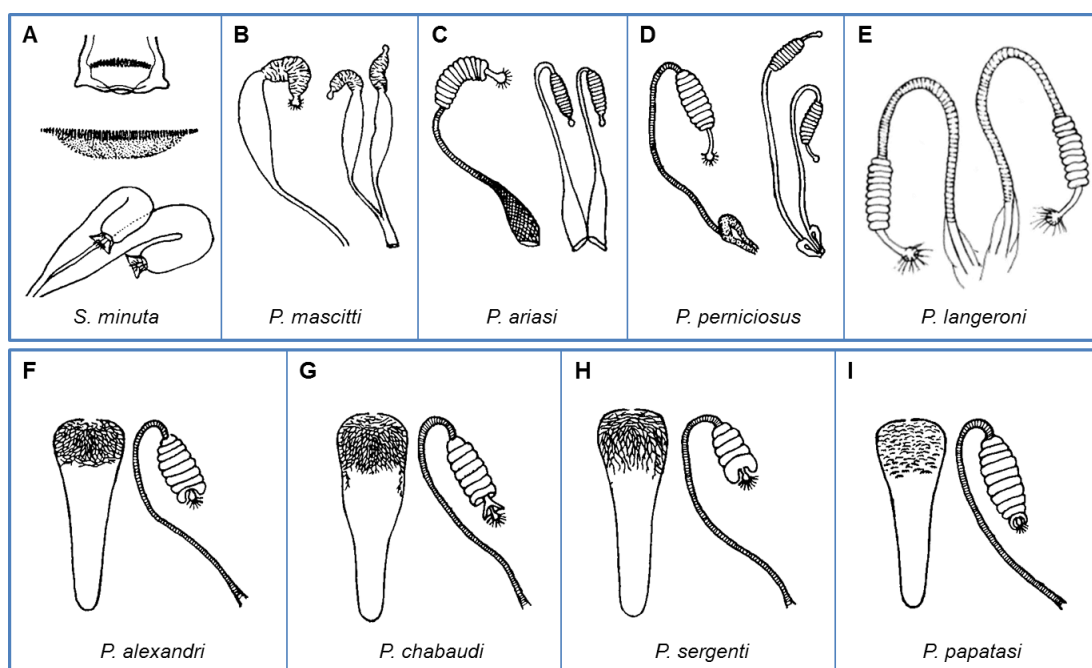


Figura 48. Características taxonómicas de la espermateca, cibario y armadura faríngea de las hembras de flebotomo de las especies presentes en la Península Ibérica. **A)** Cibario y espermateca de *S. minuta*; **B)** espermateca de *P. mascitti*; **C)** espermateca de *P. ariasi*; **D)** espermateca de *P. perniciosus*; **E)** espermateca de *P. langeroni*; **F)** faringe y espermateca de *P. alexandri*; **G)** faringe y espermateca de *P. chabaudi*; **H)** faringe y espermateca de *P. sergenti*; **I)** faringe y espermateca de *P. papatasi*. Fuente: modificado de Gállego-Berenguer y col., 1992; Martínez-Ortega y col., 1996.

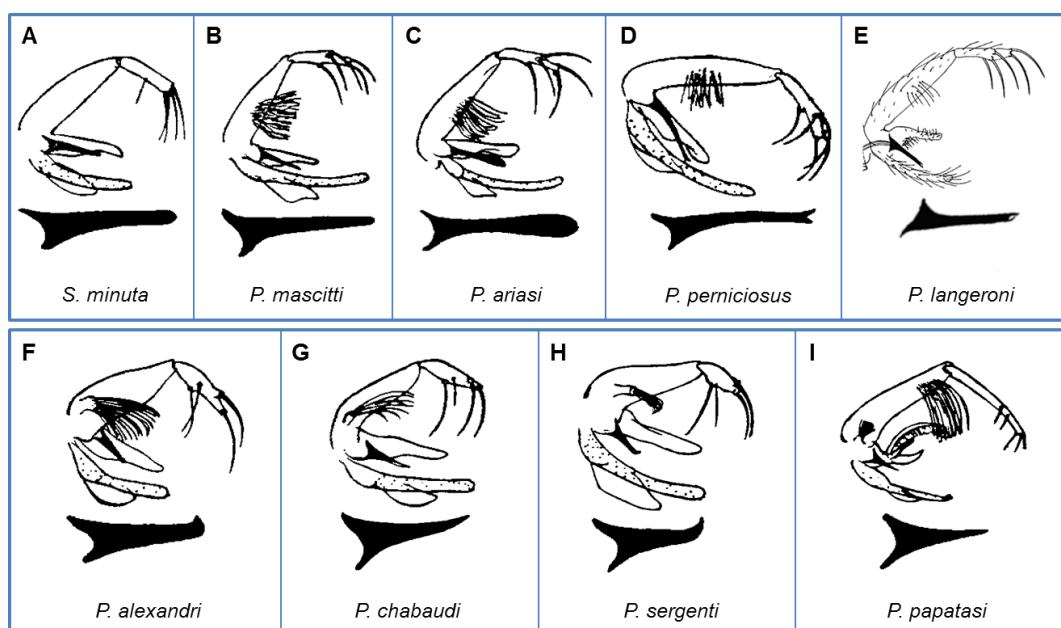


Figura 49. Características taxonómicas de la genitalia de los machos de flebotomos de las especies existentes en la Península Ibérica. **A)** *S. minuta*; **B)** *P. mascitti*; **C)** *P. ariasi*; **D)** *P. perniciosus*; **E)** *P. langeroni*; **F)** *P. alexandri*; **G)** *P. chabaudi*; **H)** *P. sergenti*; **I)** *P. papatasi*. Fuente: modificado de Gállego-Berenguer y col., 1992; Martínez-Ortega y col., 1996.

Reactivos empleados para el aclarado y montaje de los flebotomos

1) Medio de aclarado Marc-André

- Disolver 40 g de hidrato de cloral (Merck®) en 30 ml de agua destilada.
- Añadir 30 ml de acético glacial.

2) Medio de montaje Hoyer

- Disolver 30 g de goma arábica (Merck®) y 200 g de hidrato de cloral en 20 ml de glicerina (Merck®) y 50 ml de agua destilada.
- Filtrar la mezcla a través de papel de filtro antes de su uso.

3.2.2.2. Trampas de luz tipo CDC

Las trampas de luz tipo CDC (John W. Hock®) son trampas de atracción en las que los flebotomos se ven atraídos por una fuente de luz, siendo succionados al acercarse a la trampa. Estas trampas constan de una bombilla de tipo incandescente conectada a una batería, un ventilador y una jaula. Los flebotomos quedan atrapados en la jaula sin posibilidad de salir debido a la permanente corriente de aire ejercida por el ventilador (Figura 50). Estas trampas se colocaron durante dos noches consecutivas en los dos puntos de muestreo de cada estación (especificados en la Tabla 2), siendo reemplazadas cada mañana. Las trampas se ubicaron en lugares donde estuvieran lo más protegidas posible de la acción del viento y de la influencia de fuentes de luz artificial que pudieran interferir en la captura de los flebotomos durante la noche. Las jaulas retiradas de las

trampas cada mañana se guardaban en bolsas transparentes que contenían una bola de papel humedecido con agua para mantener el grado de humedad adecuado. A su vez, cada jaula era colocada en otra bolsa de color negro, en las cuales eran trasladadas hasta el laboratorio, donde ya era posible mantener las jaulas en las condiciones adecuadas dentro de una cámara climática.

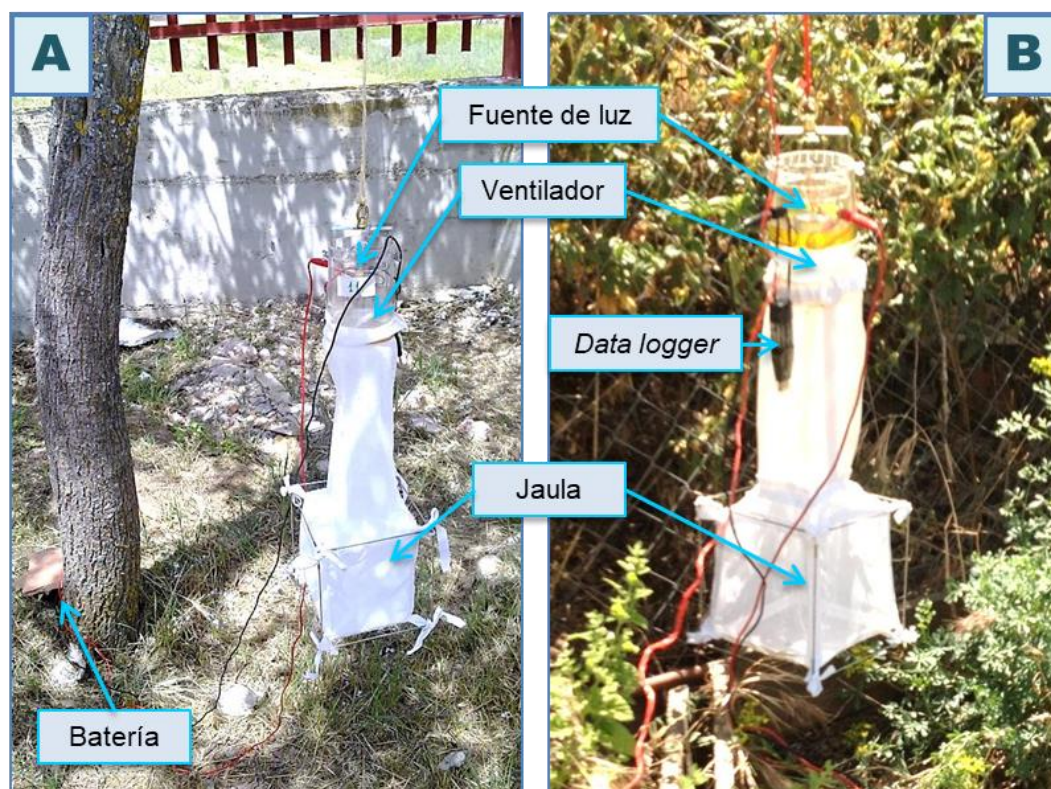


Figura 50. Trampas de luz tipo CDC en las que se señalan los diferentes componentes. **A)** Trampa de luz colgada de un árbol en el punto de muestreo JIC2; **B)** trampa de luz colocada en el punto de muestreo POL2. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).

En la estación ATE, las trampas se colocaron en zonas ajardinadas del interior del patio del centro educativo y cerca de las instalaciones deportivas adyacentes (Figura 51A). En la estación BOS, una de las trampas se colgó de un cartel informativo, junto a la valla que separa el centro del parque forestal y a una rejilla de un sumidero de agua de lluvia (BOS1), mientras que la otra trampa se ubicó en el alero de una caseta de madera (BOS2). Además, las dos trampas se ubicaron en la parte más alejada del camino de paso del parque, lejos de otras fuentes de luz (Figura 51B). En la estación JIC, la trampa del punto JIC1 se colocó junto a una caseta de ladrillo ubicada dentro del patio del centro educativo, mientras que en el segundo punto (JIC2) la trampa se colgó de la rama de un árbol presente en un terreno vallado adyacente al centro educativo, limítrofe al Parque Forestal de Bosquesur (Figura 51C). Por último, en la estación POL, la trampa del punto POL1 se colocó junto a una caseta de madera y una leñera; mientras que la trampa del punto POL2 se colgó de una valla, junto a un huerto y a una zona de compostaje, con diversas plantas como vides, cidronela y hierbabuena (Figura 51D).



Figura 51. Localización de las trampas de luz tipo CDC en las cuatro estaciones de muestreo: **A)** ATE; **B)** BOS; **C)** JIC; **D)** POL. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).

Cada trampa de luz fue procesada individualmente. Por un lado, las hembras vivas sin sangre eran separadas con ayuda de un captador de boca y anestesiadas con CO_2 , para luego colocarlas en una placa Petri con PBS 1X y detergente al 5%. Estas hembras se disecaban con el fin de estudiar la presencia de promastigotes en los tubos digestivos a la vez que eran clasificadas taxonómicamente (apartado 3.3). El resto de ejemplares (machos vivos y muertos, hembras muertas con y sin sangre, y hembras vivas con sangre) eran conservados por separado en tubos con etanol de 70° a 4 °C. Los machos fueron clasificados directamente bajo el microscopio, sin utilizar medio de montaje, mientras que las hembras fueron procesadas para su análisis molecular (Figura 52).

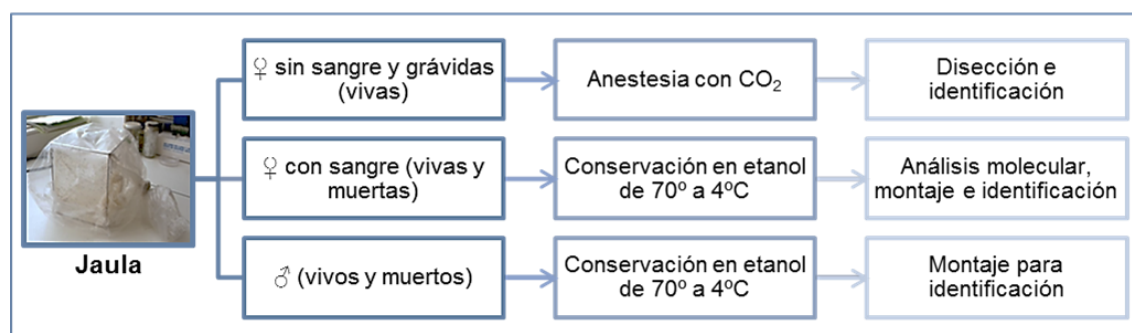


Figura 52. Esquema del procesamiento de las hembras y machos capturados mediante trampas de luz tipo CDC. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).

A partir del número total de flebotomos capturados mediante trampas de luz se calculó la abundancia relativa de cada especie: $(N^{\circ} \text{ de flebotomos capturados de una especie} / N^{\circ} \text{ total de flebotomos capturados}) \times 100$.

3.3. Disección de las hembras de flebotomo capturadas vivas

La disección de hembras capturadas vivas con las trampas CDC permite visualizar, con ayuda de un microscopio de contraste de fases, la presencia de promastigotes en el tubo digestivo en aquellos ejemplares que se encuentren infectados, permitiendo determinar las tasas de infección por *Leishmania* spp. También permite llevar a cabo el aislamiento de los promastigotes detectados para su posterior cultivo, conservación y caracterización molecular. Hay que señalar que no se pudo realizar la disección de todas las hembras vivas sin sangre en aquellos muestreos en los que las capturas fueron excepcionalmente altas. En esos casos, las hembras no disecadas fueron conservadas en etanol de 70° a 4°C y una parte de las mismas (10%) fue analizada mediante métodos moleculares, al no ser asumible por el laboratorio el procesamiento de todas las muestras.

Para la disección de las hembras todo el material utilizado fue esterilizado previamente en horno o autoclave. Con ayuda de agujas entomológicas estériles, las hembras, previamente colocadas en una placa de Petri con PBS 1X y detergente al 5%, se dispusieron individualmente sobre una gota de PBS 1X estéril. El detergente permite eliminar las ceras que recubre la cutícula de los flebotomos, facilitando que se sumerjan totalmente y no floten. En primer lugar, utilizando las mismas agujas entomológicas, se retiraron la cabeza, las patas y las alas y posteriormente, se pasó el tórax y el abdomen a otra gota de PBS, en la cual se extraía fuera del abdomen, con sumo cuidado, el aparato digestivo completo (Figura 53). Finalmente, el tubo digestivo se pasaba a una tercera gota de PBS 1X, donde también se colocaba la genitalia, para posteriormente colocar un cubreobjetos circular estéril de 10 mm de diámetro y proceder a su observación en el microscopio de contraste de fases para detectar la posible infección (Figura 54) y clasificar taxonómicamente el ejemplar.

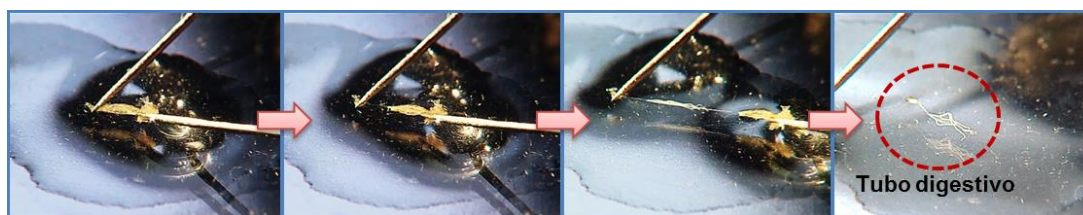


Figura 53. Proceso de disección del tubo digestivo de una hembra de flebotomo bajo microscopio estereoscópico. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).

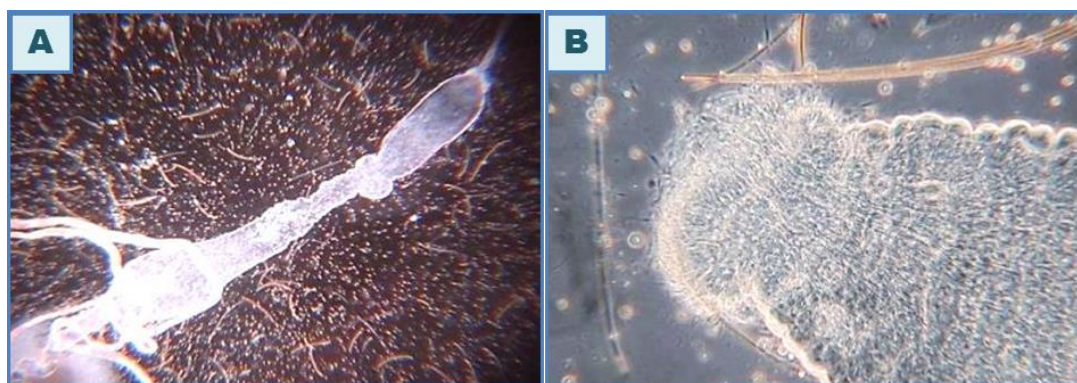


Figura 54. Observación del tubo digestivo bajo microscopio de contraste de fases para detectar la presencia de formas flageladas. **A)** Tubo digestivo infectado con promastigotes de *Leishmania* observado a un aumento de 100X; **B)** Detalle a un aumento de 400X de la VE de un flebotomo bloqueada por la presencia de un elevado número de promastigotes. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).

3.4. Aislamiento de promastigotes a partir del tubo digestivo infectado de un flebotomo

En aquellos casos en los que se observaron promastigotes en el tubo digestivo, se procedió a su aislamiento. Para ello se aplicaba una ligera presión sobre el cubreobjetos, con el fin de liberar los promastigotes del tubo digestivo. Luego, con ayuda de unas pinzas de punta curva extrafina, se retiraba el cubreobjetos y con una pipeta Pasteur estéril de plástico se recogía el PBS 1X que contenía los promastigotes para su siembra en tubos de rosca con 200 μ l de medio M199 (Sigma-Aldrich®) suplementado con suero bovino fetal (SBF) (20%) (HyClone®) y penicilina-estreptomicina (1,6%) (10.000 U/ml de cada antibiótico) (Lonza BioWitthaker®). Este paso era repetido añadiendo un par de gotas de PBS 1X para sembrar un segundo tubo, recogiendo así el máximo número de promastigotes posible. Todo el procedimiento se realizó utilizando un mechero Bunsen que permitía generar una zona de trabajo estéril en la que trabajar y esterilizar, mediante flameado, las agujas entomológicas entre cada disección.

Los tubos eran incubados en una estufa de cultivos a 27°C durante 3-4 días, tras los cuales se comprobaba el crecimiento del parásito. En aquellos aislados donde se observó proliferación de los promastigotes, su contenido era trasvasado a tubos con medio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) al que se le añadía medio RPMI suplementado con SBF (10%) (Lonza BioWitthaker®) y penicilina-estreptomicina (0,8%) (10.000 U/ml de cada antibiótico) (Lonza BioWitthaker®).

Finalmente, los aislados se cultivaron en frascos para cultivo (Falcon®) con medio NNN y RPMI, para obtener un mayor volumen de cultivo y poder proceder a la extracción de ácidos nucleicos y el almacenamiento en nitrógeno (N₂) líquido de cada aislado.

Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de los promastigotes

- Medio de cultivo NNN

1) Preparación del agar:

- Bacto-agar (Conda®): 14 g
- NaCl (Merck®): 6 g
- Agua destilada c.s.p.: 900 ml

Mezclar los reactivos y llevar a ebullición. Esterilizar en autoclave a 120°C y 1 atm, durante 20 min.

2) Preparación de los tubos:

Se funde el agar y se deja atemperar a 50°C. Se realiza la mezcla de agar, sangre y antibióticos:

- Agar: 50 ml
- Sangre desfibrinada de conejo: 25 ml
- Penicilina-estreptomicina (Lonza BioWitthaker®) (10.000 U/ml de cada uno): 5 ml

Se mezcla con cuidado y se añade a cada tubo 2 ml, colocándolos en plano inclinado hasta que el agar solidifique. En el caso de los frascos Falcon, se añaden 12 ml de la mezcla y se reparte de manera que forme una película fina en la pared del frasco. Tanto los tubos como los frascos se conservan a 4°C.

3.4.1. Crioconservación de promastigotes en N₂ líquido

Para la crioconservación en N₂ líquido, el cultivo era centrifugado a 4°C durante 5 min a una velocidad de 1.500 rpm. Se retiraba el medio líquido y el precipitado formado por los promastigotes era resuspendido con una mezcla de 3,5 ml de medio RPMI (Sigma-Aldrich®), 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®) y 0,5 ml de SBF (HyClone®). La mezcla final era distribuida en criotubos a razón de 1 ml en cada uno. Para que el proceso de congelación fuera progresivo, los tubos eran envueltos en algodón y conservados dentro de una caja de corcho un mínimo de 24 h a -80°C para después proceder a su almacenamiento definitivo en N₂ líquido.

3.5. Caracterización de los aislados

3.5.1. Extracción de ADN a partir de cultivos de *Leishmania*

Para la extracción de ADN de los cultivos de promastigotes obtenidos de los flebotomos, los promastigotes fueron concentrados por centrifugación (10 min a 4°C y 3000 rpm) y lavados con cloruro sódico (NaCl) al 0,3%, que provoca la lisis de los eritrocitos, y PBS 1X, obteniendo un precipitado de promastigotes libre de glóbulos rojos y restos de medio de cultivo. Los lavados se realizaron mediante la resuspensión y posterior centrifugación, siguiendo las condiciones anteriores.

A partir del sedimento obtenido se realizó la extracción de ADN utilizando los reactivos “DNeasy Blood & Tissue kit” (Qiagen®), siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial. Se realizaron dos eluciones de 100 µl en tampón de elución.

3.5.2. Cuantificación de ADN

Para la determinación de la concentración de ácidos nucleicos se llevó a cabo la medida de la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop™). El grado de pureza de las muestras de ADN fue determinado mediante el cociente A260/A280, que se consideró adecuado cuando los valores estaban comprendidos entre 1,6 y 2.

3.5.3. Amplificación mediante PCR de las regiones ITS1 e ITS2

Para la identificación de los promastigotes aislados se llevó a cabo la amplificación de las regiones ITS de los genes ribosomales ITS1 (300-350 pb) e ITS2 (700-750 pb) siguiendo los estudios de El Tai y col., 2000, con ligeras modificaciones. Esta amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl en los que se añadieron: 5 µl de Buffer 10X (Biotools®), 3 µl de MgCl₂ 50 mM (Biotools®), 1 µl de dNTPs 10 mM (Biotools®), 2 µl de BSA 20 mg/ml (Roche®), 0,5 µl de la enzima “HotSplit DNA Polymerase” (Biotools®), 1 µl de cada cebador a una concentración de 25 pmol y agua libre de ADNasas (Sigma-Aldrich®) hasta completar el volumen. Los cebadores utilizados y las condiciones de la reacción se especifican en las Tablas 4 y 5. En todas las reacciones se incorporaron un control negativo de PCR y un blanco de extracción.

Tabla 4. Cebadores utilizados en la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2.

Región	Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
ITS1	MEST-1	CTG GAT CAT TTT CCG ATG	El Tai y col., 2000
	MEST-2	TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT	
ITS2	MEST-3	AAG TGC GAT AAG TGG TA	
	MEST-4	ACA CTC AGG TCT GTA AAC	

Tabla 5. Condiciones de la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94	6 min	1
Desnaturalización	95	20 s	32
Anillamiento	53	30 s	
Polimerización	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	1

Para evitar contaminaciones durante el análisis molecular de las muestras, la Master Mix para la PCR se llevó a cabo en un laboratorio separado donde no se manipula muestra alguna de ADN ni se introduce material que haya estado en contacto con ADN. Así mismo, los termocicladores utilizados se ubicaban en una sala aparte. Por otro lado, se utilizaba material exclusivo en cada sala. Estas precauciones fueron adoptadas en todos los protocolos de amplificación de ácidos nucleicos que se describen en apartados posteriores.

3.5.4. Electroforesis de ácidos nucleicos

Tras las reacciones de PCR, se llevó a cabo la separación de ácidos nucleicos según su peso molecular mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa D-1 (Conda®) al 1,5%, en solución TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Para la visualización de las bandas de ADN se añadió el reactivo “Pronasafe Nucleic Acid Staining Solution” (10 mg/ml) (Conda®) a la solución de agarosa a una concentración final de 0,8 µg/ml. Para la carga de las muestras en el gel se utilizó una solución de azul de bromofenol (0,25%), glicerol (30%) y agua destilada como tampón de carga. Para la estimación del peso molecular de los fragmentos separados se utilizaron patrones de peso molecular conocido: marcador de 100 pb de rango 100-1.000 pb (Biotools®) y marcador de 1 Kb de rango 250-10.000 pb (Biotools®). El proceso de electroforesis se realizó en cubetas Bio-Rad® a voltaje constante. Finalmente, los geles se observaron en un transiluminador mediante exposición a luz UV, el cual estaba conectado a un sistema de captura de imágenes DNR MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems Ltd.), usando el programa GelCapture (Bio-Imaging Systems Ltd.).

3.5.5. Purificación de las bandas

Tras la electroforesis en gel de agarosa, las bandas observadas en el transiluminador fueron separadas del gel con ayuda de un bisturí y purificadas mediante el kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen®), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para evitar contaminación cruzada entre las muestras se utilizó una hoja de bisturí estéril para cada una de las bandas. La elución final fue cuantificada para determinar la concentración de ADN obtenida tras la purificación (Apartado 3.5.2).

3.5.6. Secuenciación y análisis bioinformático de las secuencias

El ADN obtenido tras la purificación de bandas fue sometido a un proceso de secuenciación llevado a cabo según el método enzimático de terminación de cadena o método didesoxi de Sanger (Sanger y col., 1977). Para la secuenciación se preparaba una mezcla del ADN purificado, a razón de 1 ng de ADN por cada 100 pb del fragmento final a secuenciar, y el cebador correspondiente a una concentración de 6 pmol/μl, en un volumen final de 10 μl. Esta mezcla era remitida a la Unidad de Genómica del ISCIII, donde se llevaba a cabo a una reacción de amplificación empleando “Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit” (PE Biosystems®). Los cebadores utilizados para la secuenciación fueron los mismos que los descritos para la reacción de amplificación. En el caso de la secuenciación del fragmento ITS2, se diseñaron un par de cebadores internos: F1int_ITS2 (5'-TGT GTG GGT GCG CGC GTG-3') y F2int_ITS2 (5'-TGC ACT CTC TTT TGT GTG-3'). La lectura de cada secuencia se realizó en un secuenciador ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems®).

Las secuencias obtenidas fueron editadas mediante el programa bioinformático ChromasPro (Technelysium). Por otro lado, la alineación de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa Megalign y Seqman (DNASTar® Lasergen), utilizando el método ClustalW que permite estudiar las regiones polimórficas e identificar el genotipo de los aislados (Kuhls y col., 2005). Para la búsqueda de homologías e identificación de las secuencias en la base de datos Genbank® se utilizó el programa BLAST® (NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.6. Estudio de las tasas de infección de flebotomos mediante detección molecular

3.6.1. Extracción de ácidos nucleicos a partir de flebotomos

El primer paso para la extracción de ácidos nucleicos a partir de flebotomos fue el lavado de los mismos para eliminar el etanol de 70° en el que estaban conservados. Para ello, los flebotomos fueron sometidos a 8 lavados en placas de ELISA de 96 pocillos (Corning®) en las cuales se dispuso 200 μl de agua estéril en cada pocillo. El proceso de lavado se realizó por agitación utilizando un agitador IKA KS 130 basic (IKA®) durante 5 min cada lavado y a una velocidad de agitación de 400 mot. Los flebotomos se colocaban en la primera fila de pocillos con ayuda de unas pinzas blandas, transfiriéndose a la fila siguiente tras los 5 min de cada lavado (Figura 55).

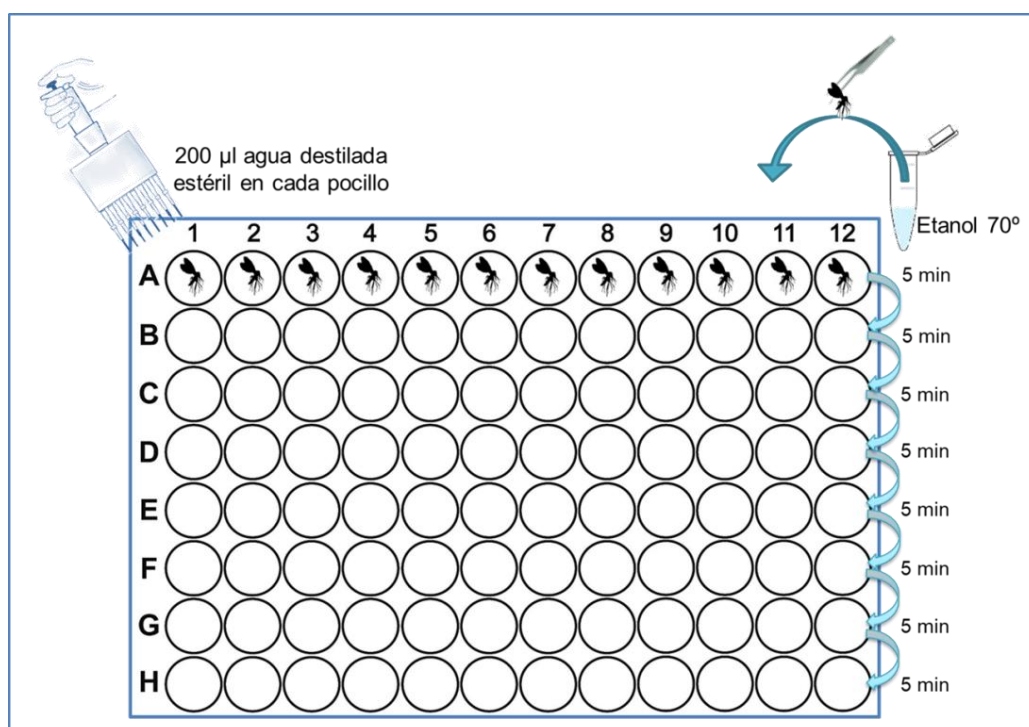


Figura 55. Esquema del proceso de lavado en placas de ELISA de los flebotomos. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).

A continuación, los flebotomos fueron disecados individualmente sobre un portaobjetos con ayuda de un microscopio estereoscópico, separando patas, alas, cabeza y genitalia con agujas entomológicas estériles. El tórax y el abdomen se disponían en un tubo de rosca con 50 µl de tampón de lisis (Figura 56).

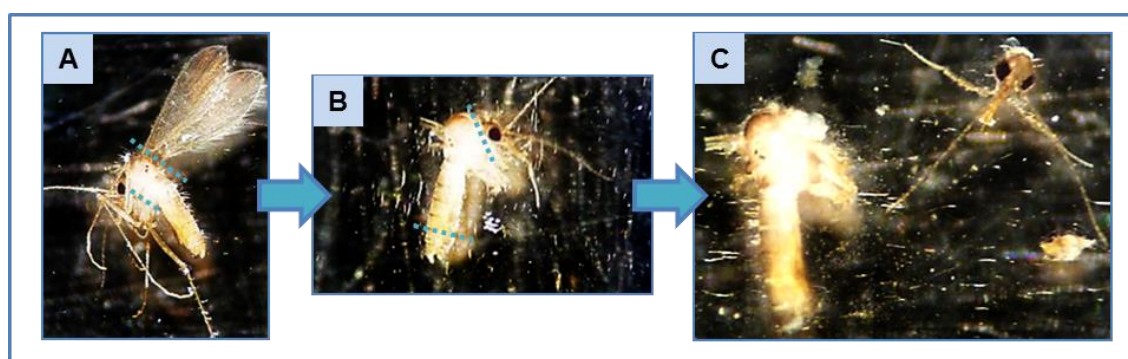


Figura 56. Disección de una hembra de flebotomo para la posterior extracción de ADN. **A)** Eliminación de patas y alas; **B)** separación de la cabeza y la genitalia; **C)** el tórax y el abdomen se pasan al tubo con tampón de lisis. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).

La cabeza y la genitalia eran montadas para su clasificación taxonómica, tal como se explicó en el apartado 3.2.2.1. Las agujas entomológicas eran esterilizadas en la llama de un mechero Bunsen entre la disección de cada flebotomo, para evitar contaminaciones. En el caso de las hembras en las que se visualizaba sangre en su abdomen, se anotaba el grado de digestión de la sangre atendiendo a la clave mostrada en la Figura 57.

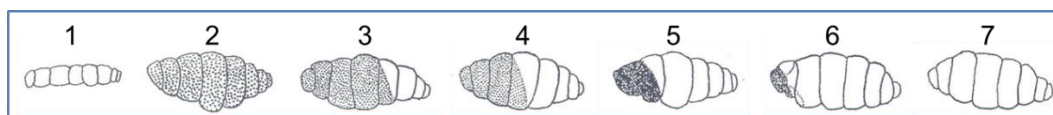


Figura 57. Fases del proceso de digestión de la sangre ingerida por un flebotomo: **1)** abdomen sin sangre; **2)** abdomen inmediatamente después de la ingesta de sangre; **3)** 24 h postingesta; **4)** 48 h postingesta; **5)** 72 h postingesta; **6)** 96h postingesta; **7)** abdomen tras la digestión total de la sangre ingerida. Fuente: modificado de Dolmatova y Demina, 1971.

Para la correcta lisis de los flebotomos, el tórax y el abdomen depositados en 50 µl del tampón de lisis contenidos en tubos de rosca se sometieron a un proceso de rotura mecánica con ayuda de pistilos de polipropileno esterilizados previamente en autoclave. El ADN se aisló mediante el kit “DNeasy Blood & Tissue kit” (Qiagen®), siguiendo el protocolo de la casa comercial. Por cada flebotomo se realizaron dos eluciones de ADN de 100 µl cada una en tampón de elución. Con excepción del lavado en placas de ELISA y la disección de los flebotomos, el resto de pasos de este protocolo fueron realizados en cabina de bioseguridad tipo IIA (Heraeus®) para evitar contaminaciones. En todas las extracciones se utilizó un blanco de extracción que contenía exclusivamente los reactivos utilizados.

3.6.2. Protocolos de amplificación de ADN para detección de *Leishmania* spp. y otros tripanosomátidos

A continuación se detallan los diferentes protocolos de PCR llevados a cabo para la detección de *Leishmania* spp. y otros tripanosomátidos en las hembras de flebotomo capturadas en el área del brote.

3.6.2.1. PCR ADNk

Para la detección de *Leishmania* spp. se realizó la amplificación de un segmento de 120 pb de la región conservada de los minicírculos del ADN del kinetoplasto. Los cebadores utilizados en esta reacción de amplificación fueron los anotados por Nicolas y col., 2002. En la reacción se utilizaron 30 ng de ADN por muestra en un volumen total de 20 µl, en los que se utilizaron 2 µl de Buffer 10X (Biotools®), 0,8 µl de MgCl₂ 50 mM (Biotools®), 0,2 µl de dNTPs 10 mM (Biotools®), 0,8 µl de BSA 20 mg/ml (Roche®), 0,5 µl de la enzima “HotSplit DNA Polymerase” (Biotools®), 1 µl de los cebadores JW11 [5'-CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT-3'] y JW12 [5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA-3'] a concentración 5 pmol y agua libre de ADNasas (Sigma-Aldrich®) hasta completar el volumen. Las condiciones de la reacción se muestran en la Tabla 6. En todas las reacciones se incluyeron un control negativo de PCR, ADN extraído de flebotomos de la colonia mantenida en el LEM (CNM-ISCI) (Molina, 1991), un blanco de extracción y un control positivo [10 pg de ADN de promastigotes de *L. infantum* JPCM5 (MCAN/ES/98/LLM-877), clon de una cepa aislada a partir del bazo de un perro naturalmente infectado].

Tabla 6. Condiciones de la amplificación del fragmento de 120 pb de ADNk.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94	6 min	1
Desnaturalización	94	30 s	40
Anillamiento	53	45 s	
Polimerización	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	1

3.6.2.2. PCR *cpb*

La amplificación del fragmento del gen *cpb* se llevó a cabo mediante una reacción en la que se utilizaron 60 ng de ADN de la muestra en un volumen de 50 µl, en los cuales se añadieron 5 µl de Buffer 10X (Biotools®), 3 µl de MgCl₂ 50 mM (Biotools®), 1 µl de dNTPs 10mM (Biotools®), 2 µl de BSA 20 mg/ml (Roche®), 0,5 µL de la enzima “HotSplit DNA Polymerase” (Biotools®), 1 µl de cada cebador, *cpbE* [5'-CGT GAC GCC GGT GAA GAA T-3'] y *cpbF* [5'-CGT GCA CTC GGC CGT CTT-3'], a una concentración de 40 pmol y agua libre de ADNasas (Sigma-Aldrich®) hasta completar volumen. Los cebadores utilizados son específicos para el complejo *L. donovani*, y fueron descritos por Hide y Bañuls, 2006. Este protocolo de PCR permite diferenciar entre las especies *L. donovani* y *L. infantum*, ya que el tamaño del fragmento amplificado es diferente entre ambas, siendo de 702 pb para *L. infantum* y 740 pb en el caso de *L. donovani*. En la Tabla 7 se muestran las condiciones de la reacción. En todas las reacciones se incluyeron un control negativo de PCR y un control positivo (100 pg de ADN de promastigotes de *L. infantum* JPCM5).

Tabla 7. Condiciones de la reacción de amplificación del gen *cpb*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94	6 min	1
Desnaturalización	94	30 s	40
Anillamiento	62	1 min	
Polimerización	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	1

3.6.2.3. PCR ITS1

La amplificación de la región ITS1 se llevó a cabo para la identificación de *Leishmania* spp. y otros tripanosomátidos siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.5.3. En todas las reacciones se incluyeron un control negativo de PCR y un control positivo (1 ng de ADN de promastigotes de *L. infantum* JPCM5).

3.6.2.4. PCR ARNr SSU

Para la identificación de los tripanosomátidos no incluidos en el género *Leishmania*, además de la amplificación de la región ITS1, se llevó a cabo la amplificación de un

fragmento de ≈940 pb de la ARNr SSU (Noyes y col., 1999). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl en los que se añadieron: 5 µl de Buffer 10X (Biotools®), 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM (Biotools®), 1 µl de dNTPs 10 mM (Biotools®), 2 µl de BSA 20 mg/ml (Roche®), 0,5 µl de la enzima “HotSplit DNA Polymerase” (Biotools®), 1 µl de cada cebador a 25 pmol y agua libre de ADNasas (Sigma-Aldrich®) hasta completar volumen. Los cebadores utilizados fueron TRYP927F 5'- GAA ACA AGA AAC ACG GGA G-3' y TRYP927R 5'-CTA CTG GGC AGC TTG GA-3' (Noyes y col., 1999). Las condiciones de la reacción se especifican en la Tabla 8. En todas las reacciones se incorporaron un control negativo de PCR y un control positivo (1 ng de ADN de promastigotes de *L. infantum* JPCM5).

Tabla 8. Condiciones de la amplificación del fragmento ARNr SSU.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94	6	1
Desnaturalización	94	1	
Anillamiento	51,7	1	40
Polimerización	72	1	
Extensión final	72	10	1

3.6.2.5. Electroforesis de ácidos nucleicos

La visualización de las bandas amplificadas se realizó mediante la electroforesis de los productos de PCR, tal como se describe en el apartado 3.5.4. En la estimación del peso molecular se emplearon diferentes marcadores dependiendo del tamaño de la banda esperada en cada reacción de amplificación: marcador FiX174/*Hinf*I con un rango de 48-726 pb (Biotools®), marcador de 100 pb de rango 100-1.000 pb (Biotools®) o marcador de 1 Kb de rango 250-10.000 pb (Biotools®).

3.6.2.6. Análisis filogenético

La caracterización de los tripanosomátidos detectados en hembras de flebotomo se realizó a partir de los productos de amplificación obtenidos en la PCR de ITS1 y ARNr SSU. Las bandas obtenidas fueron purificadas (apartado 3.5.5) y el ADN obtenido se sometió a secuenciación y posterior análisis mediante programas bioinformáticos (apartado 3.5.6). En la secuenciación se utilizaron los mismos cebadores que en las reacciones de amplificación y se diseñaron cuatro secuencias internas, dos para la secuenciación de la región ITS1 y dos para la secuencia de ARNr SSU (Tabla 9).

Tabla 9. Cebadores internos diseñados para la secuenciación de la región ITS1 y ARNr SSU.

Región	Nombre	Secuencia (5'-3')
ITS1	ITStrypF	CCT CGA CAC ATT GTG CGC
	ITStrypRv	GCG CAC AAT GTG TCG AGG
ARNr SSU	TRYPintFwd	GAC CAT TGT AGT CCA CAC TG
	TRYPintRv	GCG CAC AAT GTG TCG AGG

Las secuencias obtenidas se analizaron en busca de homologías en la base de datos Genbank® mediante BLAST® (NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Además, se realizó un estudio filogenético de estas secuencias junto con las anotadas en el Genbank® (Tablas 10A y 10B) siguiendo el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993) y realizando un análisis *bootstrap* con 1000 repeticiones. Para ello se ha utilizado el programa MEGA7 (Kumar y col., 2016). Posteriormente, los árboles filogenéticos obtenidos se editaron con el programa TreeGraph 2.14.0-771 beta (Stöver y Müller, 2010).

Tabla 10. Tripanosomátidos incluidos en el estudio filogenético **(A)** de la región ITS y **(B)** de la región ARNr SSU, y su nº de acceso en la base de datos del Genbank®.

A		B	
Organismo	Nº de acceso	Organismo	Nº de acceso
<i>Trypanosoma nabiasi</i>	LT575228	<i>Trypanosoma</i> sp.	AJ620568
<i>Trypanosoma nabiasi</i>	LT575229	<i>Trypanosoma nabiasi</i>	AJ843896
<i>Trypanosoma nabiasi</i>	LT575230	<i>Trypanosoma evotomys</i>	AY043356
<i>Trypanosoma nabiasi</i>	LT575231	<i>Trypanosoma</i> sp.	AY043353
<i>Trypanosoma kuseli</i>	AB175626	<i>Trypanosoma</i> sp.	AB242275
<i>Trypanosoma otospermophili</i>	AB190228	<i>Trypanosoma microti</i>	AY043354
<i>Trypanosoma lewisi</i>	FJ011094	<i>Trypanosoma microti</i>	AJ009158
<i>Trypanosoma blanchardi</i>	GU252223	<i>Trypanosoma microti</i>	AY586621
<i>Trypanosoma rabinowitschae</i>	GU252224	<i>Trypanosoma</i> sp.	AB242276
<i>Trypanosoma</i> sp.	KJ467211	<i>Trypanosoma otospermophili</i>	AB175625
<i>Trypanosoma rangeli</i>	AY230240	<i>Trypanosoma otospermophili</i>	AB190228
<i>Trypanosoma brucei</i>	AF306777	<i>Trypanosoma kuseli</i>	AB175626
<i>Trypanosoma evansi</i>	FJ127716	<i>Trypanosoma musculi</i>	AJ223568
<i>Trypanosoma theileri</i>	AB596250	<i>Trypanosoma rabinowitschae</i>	AY491765
<i>Crithidia fasciculata</i>	KY660708	<i>Trypanosoma blanchardi</i>	AY491764
		<i>Trypanosoma grosi</i>	AY043355
		<i>Trypanosoma grosi</i>	AB175264
		<i>Trypanosoma lewisi</i>	AJ009156
		<i>Trypanosoma lewisi</i>	AJ223566
		<i>Trypanosoma talpae</i>	AJ620545
		<i>Trypanosoma</i> sp.	AB520638
		<i>Trypanosoma cruzi</i>	AJ009149
		<i>Trypanosoma</i> sp.	KJ467217
		<i>Herpetomonas</i> sp.	AJ843897

3.6.3. Detección y estimación de la carga parasitaria en flebotomos infectados por *L. infantum*

3.6.3.1. Optimización y validación de una qPCR ADNk

Para la realización de esta técnica se llevó a cabo la amplificación de un fragmento de 120 pb del kinetoplasto, empleando los mismos cebadores que se utilizaron en la PCR convencional descrita anteriormente (apartado 3.6.2.1). Para la optimización de las condiciones de la reacción se llevaron a cabo diferentes pruebas modificando el número de ciclos correspondientes a la segunda desnaturalización, alineamiento y extensión (40, 45 y 50 ciclos). Por otro lado, se ajustó la concentración de cebadores para alcanzar un rendimiento óptimo en la reacción (las condiciones finales de la qPCR se indican en el apartado 4.8.1 de Resultados). El procedimiento se llevó a cabo en la plataforma Corbett Rotor-Gene 6000 real-time PCR System (Qiagen®) realizando al final de cada ciclo la adquisición de fluorescencia de SYBR® Green I. Finalmente, los productos de PCR se sometieron a electroforesis para comprobar la amplificación y comparar con los datos obtenidos mediante PCR convencional. En cada reacción se incluyeron: un control negativo libre de ADN que incluye solamente los reactivos, un control negativo de ADN (extraído a partir de hembras de *P. perniciosus* de la colonia mantenida en el LEM, CNM-ISCIII) y dos muestras de ADN de promastigotes de *L. infantum* (aislado IPER/ES/2012/POL2FL7, a partir de un flebotomo naturalmente infectado capturado en el foco de leishmaniosis de Fuenlabrada en el año 2012) a diferente concentración (10^3 promastigotes/ml y 10^6 promastigotes/ml).

3.6.3.2. Realización de la curva patrón y cálculo de la sensibilidad

Para llevar a cabo la curva patrón, se utilizó un cultivo de promastigotes (aislado IPER/ES/2012/POL2FL7) del cual se realizaron diluciones seriadas 1:10 desde una concentración de 10^7 promastigotes/ml hasta 1 promastigote/ml, previa cuantificación mediante cámara de Neubauer. A continuación se llevó a cabo la extracción de cada dilución utilizando el kit "DNeasy Blood & Tissue kit" (Qiagen®), siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial. En primer lugar, se realizó una curva patrón utilizando solamente las diluciones de promastigotes, añadiendo 1 µl de dilución en cada tubo de reacción. Por otro lado, se realizó una segunda curva patrón en la que se añadió el ADN extraído de las diluciones de promastigotes junto con 30 ng de ADN obtenido de la extracción conjunta de 7 flebotomos procedentes de la colonia de *P. perniciosus* mantenida en el LEM (CNM-ISCIII).

Para la realización de ambas curvas patrón se llevaron a cabo tres réplicas de cada una, calculando posteriormente la media y desviación estándar (DE). Así mismo, se analizó la sensibilidad y límite de detección de la técnica.

3.6.3.3. Análisis de datos

Los resultados obtenidos en las reacciones fueron analizados mediante el programa RotorGene 6000 Series versión 1.7. Los valores de ciclo umbral (Ct, *threshold point*) se calcularon en cada reacción a partir de los parámetros por defecto del programa. Se emplearon los valores Ct de los controles negativos libres de ADN como valores de corte para diferenciar entre muestras positivas y negativas.

3.7. Estudio molecular de las preferencias alimentarias en hembras de flebotomo con sangre ingerida

3.7.1. Amplificación de *cytb*

Para el estudio molecular de las preferencias alimentarias se llevó a cabo la amplificación de un fragmento conservado del gen *cytb* de vertebrados de una longitud de 359 pb. La amplificación fue llevada a cabo siguiendo los protocolos previamente publicados por Abbasi y col., 2009 y Steuber y col., 2005, con ligeras modificaciones. En la reacción de amplificación se utilizaron 40 ng de ADN, obtenido de hembras de flebotomo con sangre, en un volumen final de 25 µl: 2,5 µl de Buffer 10X (Biotools®), 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM (Biotools®), 0,25 µl de dNTPs 10 mM (Biotools®), 1 µl de BSA 20 mg/ml (Roche®), 0,5 µl de la enzima “HotSplit DNA Polymerase” (Biotools®), 0,1 µl de cada cebador a 125 µM de concentración inicial y agua libre de ADNasas (Sigma-Aldrich®) hasta completar el volumen. Las hembras de *P. perniciosus* se analizaron con las parejas de cebadores cyto1/cyto2 (Abbasi y col., 2009) y cytbb1/cytbb2 (Svobodová y col., 2009) (Tabla 11). El segundo par de cebadores son secuencias degeneradas que se utilizaron en aquellas muestras en las que con el primer par de cebadores no se obtenía banda o esta era demasiado tenue. Por otro lado, las hembras de *S. minuta* fueron analizadas con el par de cebadores degenerados cytbb1/cytbb2 y con el par B (rep/amph)/cytbb2. El cebador B (rep/amph) es específico de reptiles y anfibios (Cupp y col., 2004) (Tabla 11). Las condiciones de la reacción se detallan en la Tabla 12. En todas las reacciones se incorporaron un control negativo de PCR y un blanco de extracción.

Tabla 11. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento conservado de 359 pb del gen *cytb* de vertebrados.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Referencia
cyto1 cyto2	CCATCAAACATCTCAGCATGATGAAA CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC	Abbasi y col., 2009
cytbb1 cytbb2	CCATCMAACATYTCADCATGATGAA GCHCCTCAGAATGAYATTTGKCCTCA	Svobodová y col., 2009
B (rep/amph)	GCHGAYACHWVHHYHGCHTTYTCHTC	Cupp y col., 2004

Tabla 12. Condiciones de la reacción de amplificación del fragmento de 359 pb del gen *cytb*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones
Desnaturalización inicial	94	6 min	1
Desnaturalización	94	30 s	40
Anillamiento	55	30 s	
Polimerización	72	45 s	
Extensión final	72	10 min	

Las bandas obtenidas se purificaron y secuenciaron tal como se describe en los apartados 3.5.5 y 3.5.6, respectivamente. Las secuencias fueron analizadas mediante el programa BLAST® (NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para su identificación mediante la búsqueda de homologías en la base de datos Genbank®. Se aceptaron como válidos los resultados cuya identidad fuera igual o superior al 95%.

3.7.2. PCR-RFLP *cytb*

Esta técnica permite la diferenciación del origen de la sangre ingerida gracias a la diferencia en el patrón de bandas obtenido tras la digestión con enzimas de restricción. Para la elección de las enzimas de restricción se realizó un estudio *in silico* mediante el programa informático Seqbuilder (DNASTAR® Lasergen), con el cual se analizaron los sitios de restricción en cada fragmento de 359 pb del gen *cytb* de las especies de interés. Tras este análisis, las enzimas escogidas fueron *HaeIII* y *HinfI*, ya que la utilización de ambas enzimas daba lugar a un patrón de bandas diagnóstico que permitía identificar cada una de las secuencias. La digestión enzimática se realizó en un volumen total de 30 µl, de los cuales 25 µl correspondieron al producto de amplificación del fragmento de 359 pb del *cytb*, 3 µl al tampón correspondiente a cada enzima, 1 µl de agua libre de ADNasas (Sigma-Aldrich®) y 3U del enzima de restricción *HaeIII* o 5U *HinfI* (New England Biolabs®). La reacción se incubó durante toda la noche a 37°C. La visualización del producto digerido se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa MS-8 (Conda®) al 3% al que se añadió el reactivo “Pronasafe Nucleic Acid Staining Solution” (10 mg/ml) (Conda®). Como marcadores de peso molecular se utilizó el marcador de 100 pb (Biotools®) y el marcador de 50 pb (Takara®).

Junto con las muestras de ADN de las hembras con sangre capturadas en la zona de este estudio entomológico, se analizaron otras 9 hembras de flebotomo procedentes de Girona (n=7) y Menorca (n=2), en las que se habían identificado otras fuentes de alimentación con el fin de optimizar la técnica (muestras cedidas por la Dra. Montserrat Gállego, Universitat de Barcelona).

3.8. Análisis bioestadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Prism versión 6 (GraphPad Software®).

El estudio estadístico para analizar la posible existencia de diferencias significativas entre el número de capturas, densidad y parámetros climáticos entre los tres periodos de muestreo se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, a excepción de los parámetros climáticos del mes de junio, ya que sólo se habían recogido datos con los *data loggers* en 2013 y 2014. Las diferencias entre estos dos años en dicho mes fueron estudiadas mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Para determinar si existían diferencias significativas en las diferentes variables registradas entre meses y periodos de muestreo, se realizó un análisis de comparación múltiple mediante el test no paramétrico de Dunn.

El análisis de las diferencias en el número de flebotomos, el número de hembras y machos y los valores de temperatura y humedad relativa entre los dos puntos de cada estación se realizó mediante el test de Wilcoxon para comparación de datos apareados.

Los diferentes análisis de correlación se llevaron a cabo mediante el test no paramétrico de Spearman. El coeficiente de correlación “r”, que oscila entre -1 y +1, indica si las asociaciones entre variables son negativas o positivas, respectivamente.

En el estudio estadístico de la qPCR se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para estudiar las diferencias entre los valores Ct de las tres réplicas de cada dilución en ambas curvas, así como para determinar la existencia de diferencias significativas en la carga parasitaria estimada en las muestras entre los tres periodos de muestreo. Por otro lado, el test no paramétrico de Mann-Whitney se utilizó para analizar las posibles diferencias entre las dos curvas estándar y para estudiar los resultados de la carga parasitaria entre las hembras sin sangre y con sangre.

En todos los análisis estadísticos se ha trabajado con un nivel de significancia de 0,05. Si el valor p hallado era inferior al nivel de significancia ($p \leq 0,05$) la comparación realizada entre los parámetros analizados se consideró estadísticamente significativa.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Capturas globales de flebotomos

A lo largo de los tres periodos de muestreo se capturó un total de 45.127 flebotomos: $n=17.317$ en 2012, $n=12.407$ en 2013 y $n=15.403$ en 2014. Por otro lado, se identificaron cuatro especies de flebotomos: *P. perniciosus* ($n=33.996$), *S. minuta* ($n=11.127$), *P. papatasi* ($n=2$) y *P. sergenti* ($n=2$). En cuanto a las capturas totales en cada estación de muestreo, la estación donde más ejemplares se capturaron fue JIC ($n=17.398$), seguida por ATE ($n=12.768$), BOS ($n=9.158$) y POL ($n=5.803$).

4.2. Capturas mediante trampas adhesivas

En los siguientes apartados se desglosan los resultados de las capturas realizadas mediante las trampas adhesivas (Figura 58). El total de trampas colocadas fue de 1.200, de las cuales se recuperaron 1.191, representando una superficie muestreada total de $95,28 \text{ m}^2$.

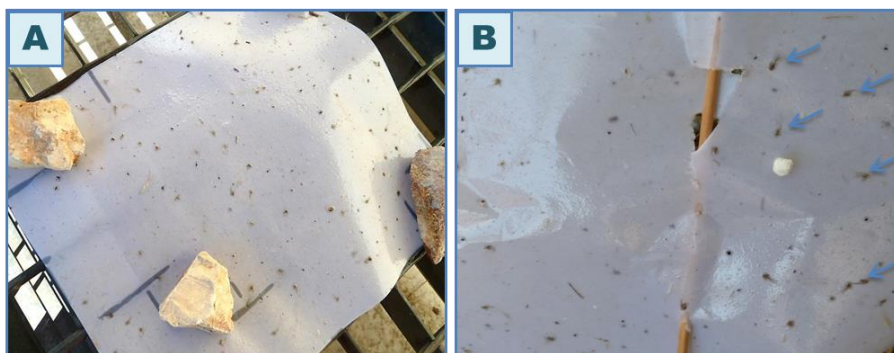


Figura 58. Flebotomos adheridos a trampas adhesivas colocadas en rejillas de aire acondicionado (A) y clavadas en el suelo mediante una varilla de madera (B). Fuente: LEM (CNM-ISCIII).

4.2.1. Diversidad de especies

Durante los tres periodos de muestreo se capturaron 28.625 ejemplares. Las especies predominantes fueron *P. perniciosus* ($n=18.446$) y *S. minuta* ($n=10.177$). La tercera especie capturada fue *P. papatasi*, de la que sólo se contabilizaron 2 ejemplares.

4.2.2. Flebotomos capturados en cada estación

El mayor número de flebotomos se registró en la estación JIC ($n=11.802$), seguida de ATE ($n=7.514$). Tal como se muestra en la Tabla 13, en estas dos estaciones, el número de ejemplares de *P. perniciosus* y *S. minuta* capturado no presentó grandes diferencias, mientras que en las estaciones BOS y POL *P. perniciosus* predominó frente a *S. minuta*. La diferencia en el número de ejemplares de *P. perniciosus* capturado entre las cuatro estaciones no fue estadísticamente significativo ($p=0,0877$). En el caso de *S. minuta*, sí se encontraron diferencias significativas entre estaciones ($p=0,0003$), concretamente entre BOS ($n=234$) y JIC ($n=5.961$) ($p=0,0194$).

Resultados

Estación	Especie de flebotomo			Total
	<i>P. perniciosus</i>	<i>S. minuta</i>	<i>P. papatasi</i>	
ATE	4.160	3.353	1	7.514
BOS	5.479	234	1	5.714
JIC	5.841	5.961	0	11.802
POL	2.966	629	0	3.595

Tabla 13. Número de ejemplares capturados de cada especie de flebotomo en cada estación de muestreo durante los tres años de estudio.

En la Figura 59 se representan las capturas de *P. perniciosus* y *S. minuta* en las diferentes estaciones. En ATE y BOS se observó un incremento en el número de *P. perniciosus* a lo largo de los tres periodos de muestreo (ATE: n=937, n=1.547 y n=1.676 en 2012, 2013 y 2014, respectivamente; BOS: n=1.659, n=1.712 y n=2.108 en 2012, 2013 y 2014, respectivamente). En la estación POL el número de *P. perniciosus* se mantuvo estable a lo largo de los tres periodos de estudio (2012, n=959; 2013, n=945; 2014, n=1.062). Por último, en la estación JIC se observó una disminución del número de *P. perniciosus* en 2013 (n=1.349), para volver a aumentar en 2014 (n=1.994), aunque sin alcanzar las cifras de 2012 (n=2.498). En el caso de *S. minuta*, en las estaciones BOS y POL se capturó un menor número de flebotomos con respecto a las otras dos estaciones, manteniéndose sin grandes variaciones a lo largo de los tres años de muestreo (BOS: n=102, n=51 y n=81 en 2012, 2013, 2014, respectivamente; POL: n=236, n=186 y n=207 en 2012, 2013 y 2014, respectivamente).

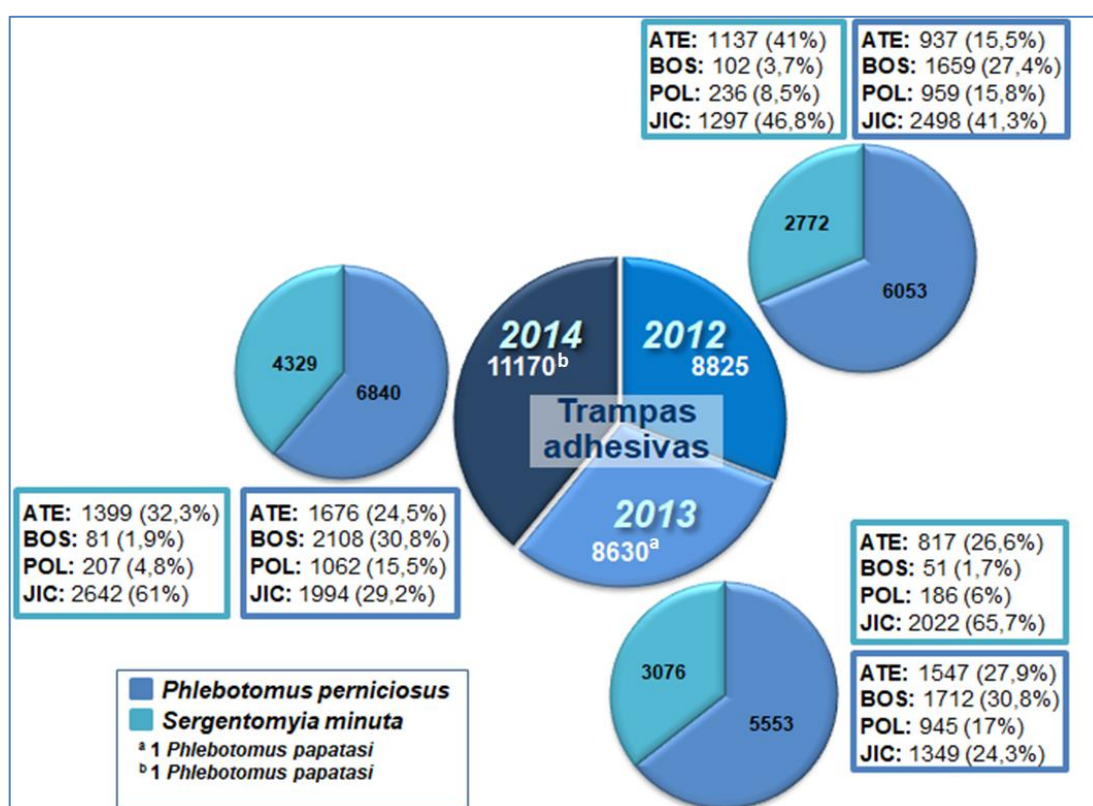


Figura 59. Número de flebotomos capturados mediante trampas adhesivas en cada estación en los tres años de muestreo.

En el caso de las estaciones ATE y JIC el mayor número de *S. minuta* fue registrado en el último año del estudio (ATE: n=1.137 en 2012, n=817 en 2013 y n=1.399 en 2014; JIC: n=1.297 en 2012, n=2.022 en 2013 y n=2.642 en 2014) (Figura 59).

4.2.3. Densidades totales

El cálculo de la densidad de cada especie de flebotomo, obtenida al dividir el número de ejemplares de cada especie por el total de superficie de trampa adhesiva muestreada (95,28 m²), mostró que *P. perniciosus* fue la especie que presentó el mayor valor, seguida por *S. minuta* y *P. papatasi*:

- 1) *P. perniciosus*: $18.446 \text{ flebotomos} / 95,28 \text{ m}^2 = 193,60 \text{ flebotomos/m}^2$
- 2) *S. minuta*: $10.177 \text{ flebotomos} / 95,28 \text{ m}^2 = 106,81 \text{ flebotomos/m}^2$
- 3) *P. papatasi*: $2 \text{ flebotomos} / 95,28 \text{ m}^2 = 0,021 \text{ flebotomos/m}^2$

P. perniciosus presentó mayor densidad en los tres periodos estudiados, alcanzando su máximo en 2014, tras un ligero descenso en 2013, tal como se representa en la Figura 60. En el caso de *S. minuta*, la densidad fue aumentando a lo largo de los tres periodos de muestreo, pero no llegó a alcanzar las cifras de *P. perniciosus* (Figura 60). El análisis de los valores de densidad de cada especie entre los tres periodos de muestreo no mostró diferencias significativas (*P. perniciosus*, p=0,4163; *S. minuta*, p=0,5824).

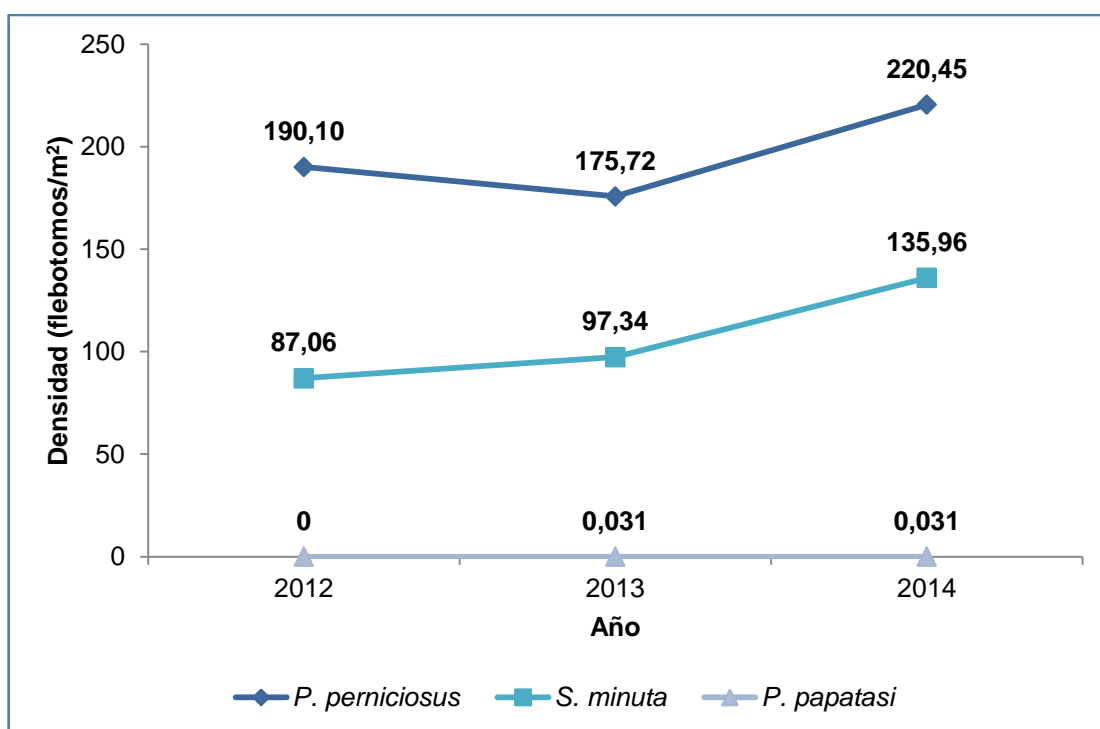
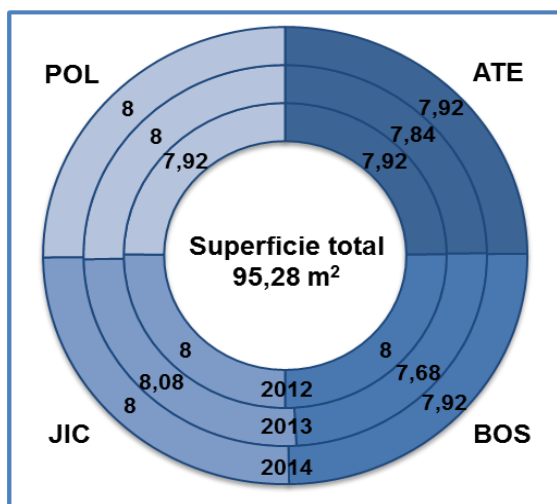


Figura 60. Evolución de la densidad (flebotomos/m²) global de las especies de flebotomos capturadas mediante trampas adhesivas a lo largo de los tres años del estudio, atendiendo a la superficie muestreada en cada uno de ellos (31,84 m² en 2012, 31,6 m² en 2013 y 31,84 m² en 2014).

4.2.4. Densidad de flebotomos por estación

En la Figura 61 se indica la superficie muestreada en cada estación durante cada año. Como se puede observar, la diferencia en la superficie muestreada entre cada estación es muy baja. Estas diferencias fueron debidas a que algunas de las trampas adhesivas no pudieron ser recuperadas. Concretamente, en 2012 desapareció una trampa en las



estaciones ATE y POL. En 2013, de las 20 trampas colocadas en cada estación, en ATE faltaron 2 y en BOS, 3. Además, en julio de ese año en BOS se colocaron 19 trampas en lugar de 20, mientras que en JIC se colocaron 21 trampas adhesivas. Por último, en 2014 desaparecieron 2 trampas, una en ATE y otra en BOS.

Figura 61. Superficie muestreada (m²) en cada estación a lo largo de cada año.

Como se muestra en la Figura 62 la mayor densidad en ambas especies se alcanzó en la estación JIC. Así mismo, *P. perniciosus* presentó mayor densidad que *S. minuta* en todas las estaciones y periodos de muestreo, a excepción del año 2012 en la estación ATE y en 2013 y 2014 en la estación JIC. También se puede observar una amplia diferencia entre las densidades de ambas especies de flebotomo en las estaciones BOS y POL. El análisis de las diferencias en la densidad de cada especie entre estaciones no fue significativo ($p=0,1887$).

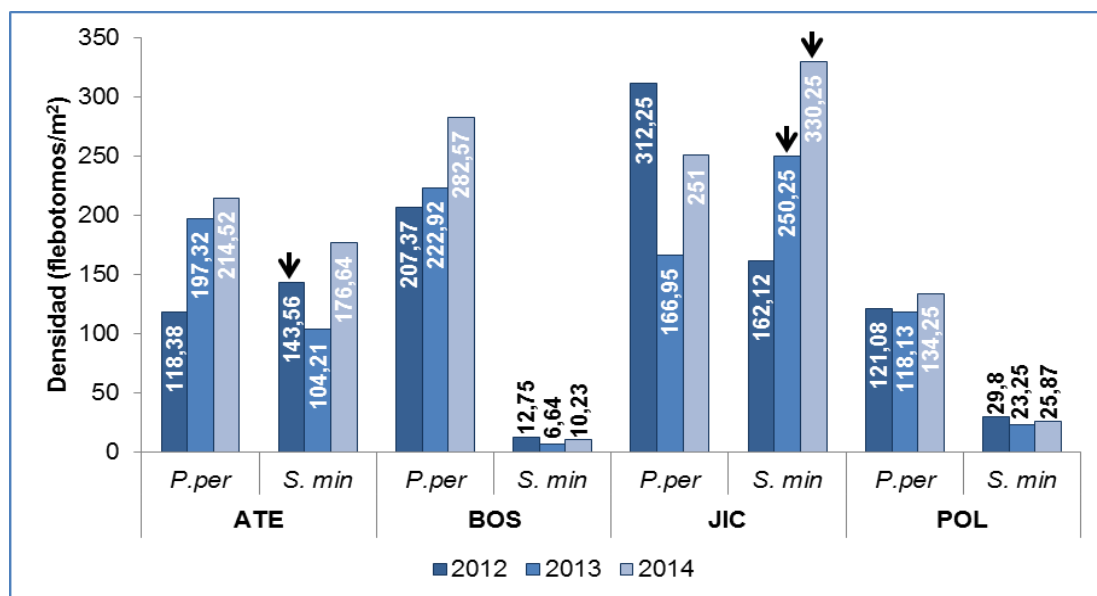


Figura 62. Densidad de *P. perniciosus* (*P. per*) y *S. minuta* (*S. min*) en cada estación de muestreo a lo largo de los tres años del estudio. (↓): Periodo de muestreo en el que la densidad de *S. minuta* fue mayor a la de *P. perniciosus*.

4.2.5. Relación machos/hembras

La relación de machos respecto a las hembras en el total del muestreo con trampas adhesivas fue muy superior en el caso de *P. perniciosus*. En esta especie un 90,2% de los ejemplares fueron machos; mientras que en el caso de *S. minuta*, el porcentaje disminuye al 56,75%. En el caso de *P. papatasi*, la relación fue del 50%, ya que sólo se capturó un ejemplar de cada género.

Por otro lado, el porcentaje de machos de cada especie fue similar a lo largo de los tres periodos de muestreo. En el caso de *P. perniciosus*, el porcentaje de machos fue del 89,98%, 90,96% y 89,77% durante 2012, 2013 y 2014, respectivamente; mientras que el porcentaje de machos de *S. minuta* capturados fue del 58,87% en 2012, del 56,60% en 2013 y del 56,78% en 2014.

Tras la identificación de los ejemplares bajo el microscopio de contraste de fases (Figura 63A y 63B) se encontró que el número de machos de *P. perniciosus* capturado fue muy superior al número de hembras en las cuatro estaciones a lo largo de los tres periodos de muestreo (Figura 66). En relación a las capturas de hembras y de machos en cada una de las estaciones a lo largo de los tres años no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$ en todos los casos), aunque sí se encontraron diferencias en el número de hembras capturado entre las cuatro estaciones ($p = 0,0174$). El análisis de comparación múltiple mostró que estas diferencias eran significativas entre el número de hembras capturado en la estación BOS ($n = 745$) y la estación POL ($n = 173$) ($p = 0,0266$). Sin embargo, al analizar el número de machos capturados entre las diferentes estaciones no se encontraron diferencias significativas ($p = 0,1476$).

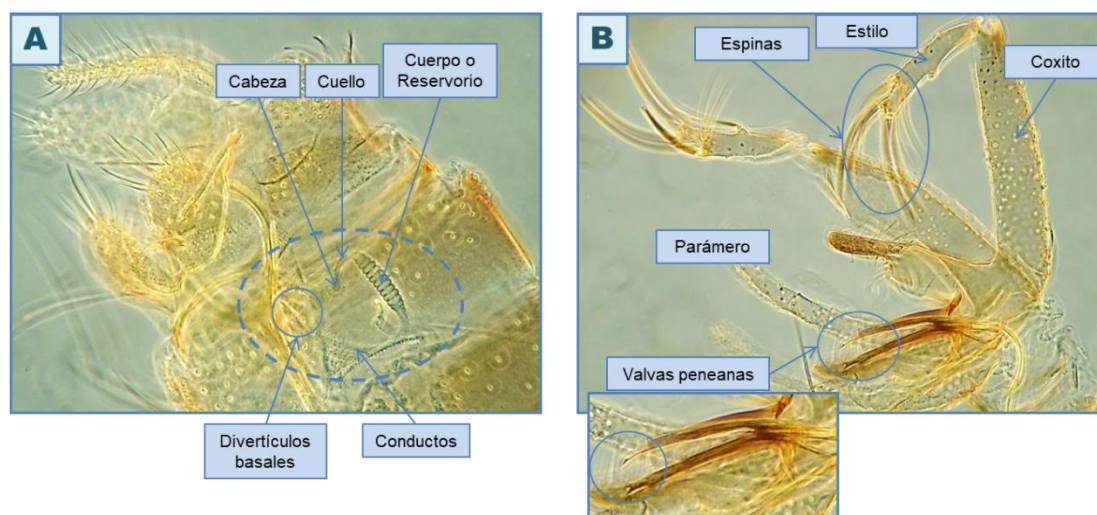
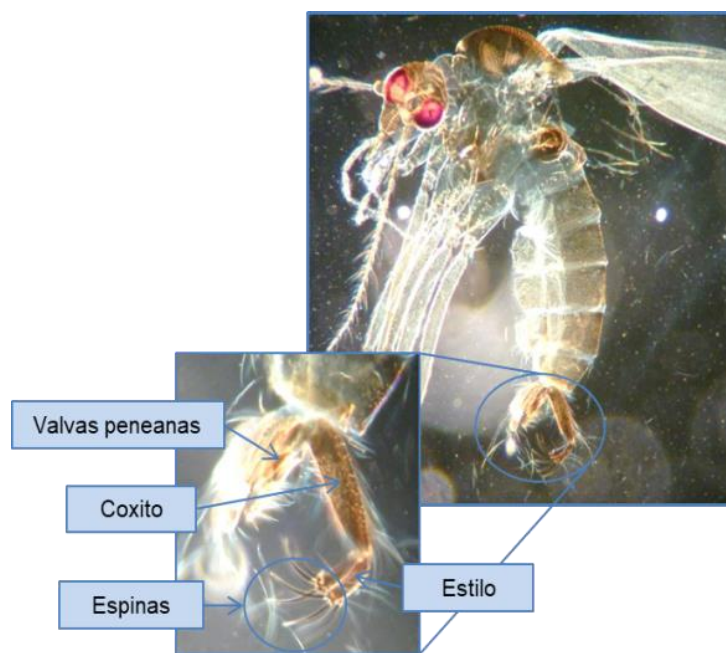


Figura 63. Detalle de las genitales de *P. perniciosus* observadas bajo microscopio de contraste de fases a un aumento total de 400x. **A)** Genitalia de una hembra donde se aprecian las espermatecas; **B)** región abdominal terminal de un macho en la que se pueden observar las estructuras del aparato genital externo. Fuente: LEM (CNM-ISCIII).

Resultados

En cuanto a los ejemplares de *S. minuta* capturados, tras la identificación de los machos (Figura 64) y las hembras (Figura 65) se encontraron diferencias en los porcentajes de cada uno entre las cuatro estaciones. Sin embargo, estas diferencias no fueron tan notables como en *P. perniciosus*. Como se muestra en la Figura 66, en la estación POL el número de hembras de *S. minuta* capturado fue superior al número de machos, al contrario que en las otras tres estaciones. Además, se constató la existencia de diferencias significativas entre las capturas de hembras entre las cuatro estaciones ($p=0,0174$), aunque el análisis múltiple no mostró diferencias entre estaciones en concreto ($p>0,05$ en todos los casos). También fueron significativas las diferencias en el número de machos capturado entre las diferentes estaciones ($p=0,0017$). En este caso, el



análisis de comparación múltiple evidenció que esas diferencias eran significativas ($p=0,0266$) entre las estaciones BOS ($n=150$) y JIC ($n=3.425$). Sin embargo, las diferencias no fueron significativas en cuanto al número de hembras y machos de *S. minuta* capturados dentro de cada estación a lo largo de los tres periodos de estudio ($p>0,05$ en todos los casos).

Figura 64. Macho de *S. minuta* montado en medio de Hoyer para su observación bajo microscopio de contraste de fases (aumento total de 100x). LEM (CNM-ISCIH).

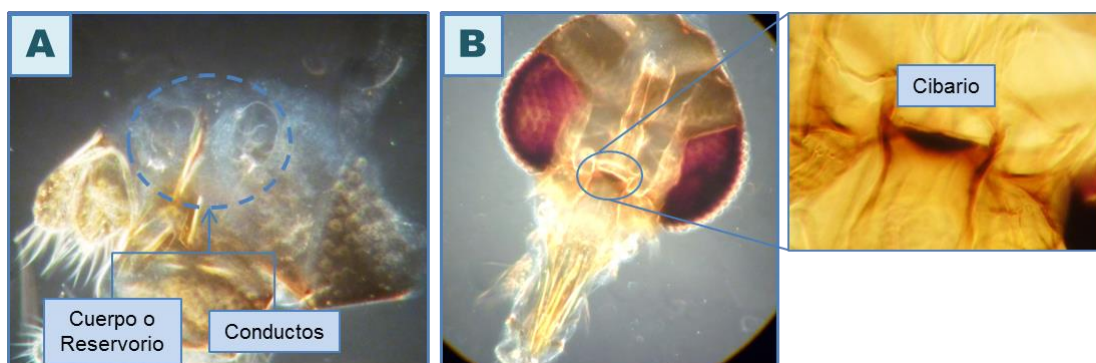


Figura 65. Hembra de *S. minuta* capturada mediante trampa adhesiva y montada en medio de Hoyer para su identificación taxonómica bajo microscopio de contraste de fases (aumento total de 100x). **A)** Región terminal del abdomen de una hembra de *S. minuta* donde se aprecia la espermateca; **B)** detalle de la cabeza donde se puede apreciar el cibario armado característico de esta especie. LEM (CNM-ISCIH).

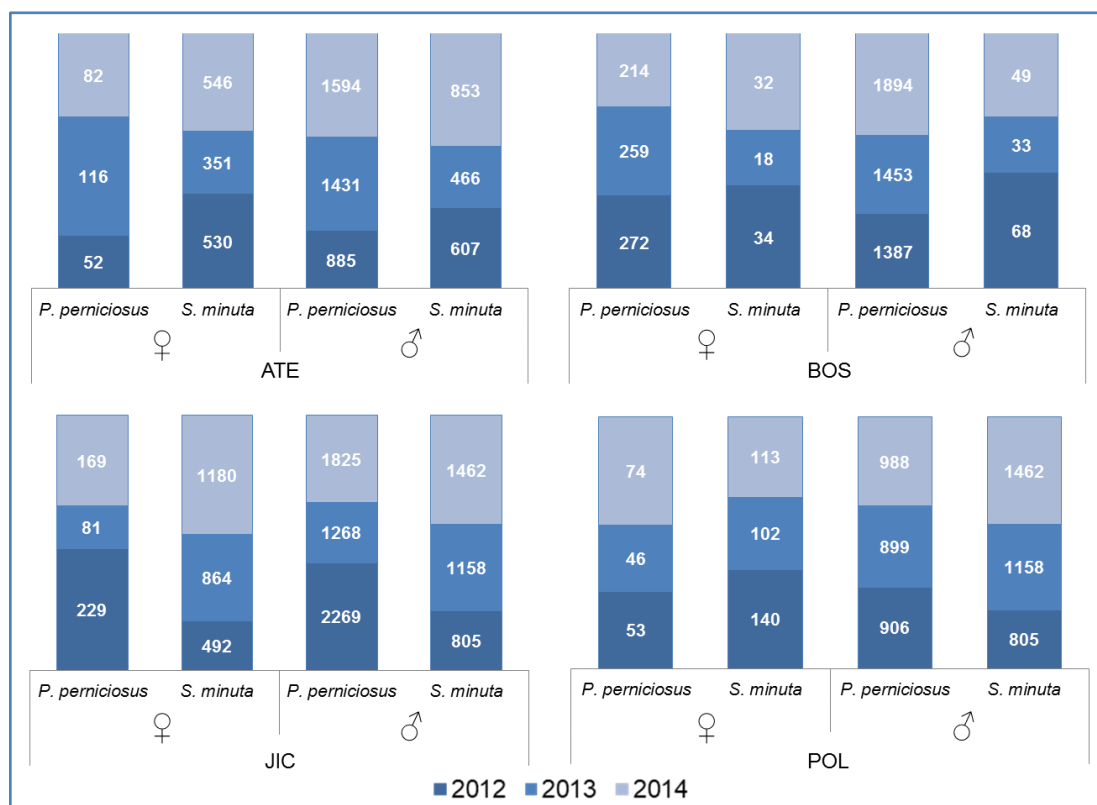


Figura 66. Número de hembras (♀) y machos (♂) de *P. perniciosus* y *S. minuta* capturados en cada estación y periodo de muestreo.

4.3. Capturas mediante trampas de luz

4.3.1. Diversidad de especies

A lo largo de los tres periodos de muestreo se capturaron 16.502 ejemplares mediante trampas de luz tipo CDC. La especie predominante con este método de captura fue *P. perniciosus* (n=15.550), seguida de *S. minuta* (n=950). La tercera especie capturada con este tipo de trampas fue *P. sergenti*, aunque solamente se capturaron 2 ejemplares.

4.3.2. Flebotomos capturados en cada estación

Como se puede observar en la Tabla 14, el mayor número de ejemplares fue capturado en la estación JIC (n=5.596), seguida de ATE (n=5.254), BOS (n=3.444) y POL (n=2.208). El análisis estadístico mostró que las diferencias en las capturas de *P. perniciosus* entre las estaciones no fueron significativas (p=0,333), pero sí lo fueron en las capturas de *S. minuta* (p=0,0328), aunque el análisis de comparación múltiple de Dunn no encontró diferencias entre estaciones en concreto (p>0,05 en todos los casos).

Estaciones	Especie de flebotomo			Total
	<i>P. perniciosus</i>	<i>S. minuta</i>	<i>P. sergenti</i>	
ATE	4.833	420	1	5.254
BOS	3.393	51	0	3.444
JIC	5.377	218	1	5.596
POL	1.947	261	0	2.208

Tabla 14. Número de ejemplares de cada especie capturado mediante trampas de luz tipo CDC en cada estación de muestreo.

La fluctuación de las capturas en cada estación se representa en la Figura 67, en la que se observa como el número de ejemplares de *P. perniciosus* capturado en el año 2012 fue superior en todas las estaciones con respecto a las capturas de los otros dos periodos, excepto en BOS. En esta estación, las capturas totales de esta especie aumentaron, alcanzando su máximo en 2014. Sin embargo, las diferencias en el número de *P. perniciosus* capturado por estación entre los tres periodos no fueron significativas ($p>0,05$ en todos los casos).

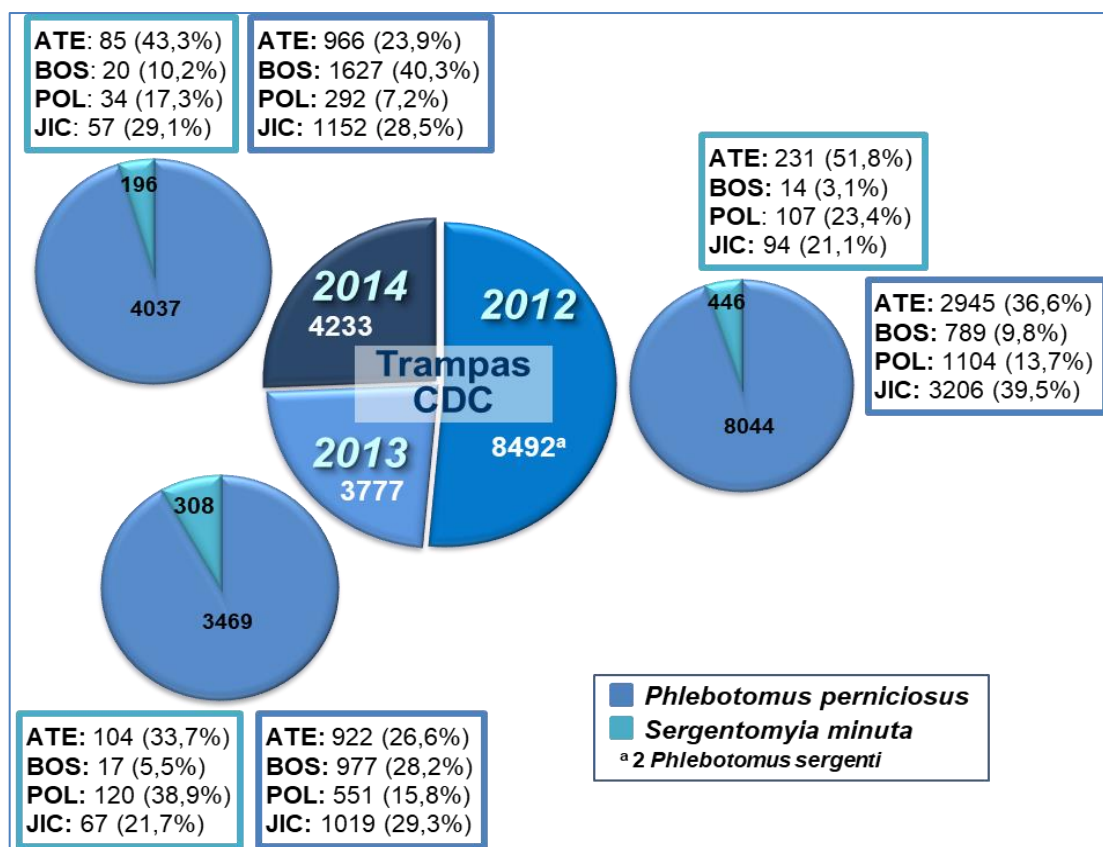


Figura 67. Flebotomos capturados mediante trampas de luz tipo CDC en cada estación de muestreo a lo largo de los tres años del estudio.

Respecto a las capturas de *S. minuta*, la Figura 67 muestra como en la estación ATE se observó una fuerte disminución en el año 2013. También se constató un descenso en el número de ejemplares en JIC, pero no tan acusado. En el caso de BOS, los ejemplares de *S. minuta* capturados fueron aumentando ligeramente. Por último, en la estación POL, las capturas en 2012 y 2013 fueron similares, mientras que en 2014 disminuyeron,

capturándose la mitad de ejemplares que en los dos años anteriores (Figura 67). Las diferencias en el total de ejemplares capturados de *S. minuta* por estación entre los tres periodos de muestreo no fueron significativas ($p>0,05$ en todos los casos).

4.3.3. Flebotomos capturados en cada punto de muestreo de las diferentes estaciones

Las capturas de flebotomos en los dos puntos de cada estación de muestreo mostraron diferencias entre ellos a lo largo del estudio. En todos los puntos de muestreo se observó un descenso en el número de flebotomos capturados, a excepción del punto BOS1, donde se apreció un incremento a lo largo de los tres años. Así mismo, en los puntos ATE2 y JIC2 en el año 2014 el número de *P. perniciosus* aumentó con respecto al 2013, pero no alcanzó las cifras del primer año. Por último, en el punto BOS2 se mantuvo más estable el número de flebotomos durante los tres años (Figura 68). El análisis estadístico encontró diferencias significativas en el número de *P. perniciosus* capturado entre los dos puntos de ATE ($p<0,0001$), BOS ($p=0,0005$) y POL ($p=0,0083$); mientras que no las encontró en JIC ($p=0,7184$). Esta diferencia fue significativa en la estación ATE durante los tres años de muestreo, mientras que en BOS lo fue en los años 2013 y 2014, y en la estación POL solamente en 2012 (Tabla 15).

Año	Estaciones			
	ATE	BOS	JIC	POL
2012	*0,0039	0,8125	0,4961	*0,0117
2013	*0,0039	*0,0234	0,1484	0,2012
2014	*0,0020	*0,0020	0,2012	0,9102

Tabla 15. Análisis de las diferencias anuales en las capturas de *P. perniciosus* entre los puntos de muestreo dentro de cada estación (test no paramétrico de Wilcoxon). (*): $p<0,05$.

En el caso de *S. minuta*, en la Figura 69 se puede comprobar que las capturas en los puntos de muestreo ATE1, BOS1, JIC1 y POL1 fueron superiores a los puntos ATE2, BOS2, JIC2 y POL2, aunque en el caso de BOS1 y BOS2 la diferencia fue menos acusada. Por otro lado, las diferencias en cada punto a lo largo del estudio siguieron una dinámica diferente. Las capturas entre los dos puntos de cada estación presentaron diferencias significativas en ATE ($p=0,0003$), POL ($p<0,0001$) y JIC ($p=0,0010$), mientras que en BOS no fueron significativas ($p=0,2993$). En los puntos ATE1 y ATE2, se observó cómo el número de capturas disminuyó de un año a otro, pero sólo fue significativo en el año 2012 ($p=0,0078$). En BOS1 el número de *S. minuta* se mantuvo constante, mientras que en BOS2 ascendió ligeramente, sin encontrarse diferencias significativas entre los dos puntos en ningún periodo. En la estación JIC, el punto JIC1 experimentó un descenso en las capturas de *S. minuta* durante el año 2013, para ascender ligeramente en 2014; mientras que en el punto JIC2 se observó un pico en el número de ejemplares capturado en el año 2013. La diferencia entre JIC1 y JIC2 sólo fue significativa en el año 2014 ($p=0,0078$). En POL1, se produjo un aumento en las capturas durante 2013, mientras que en POL2 el número de ejemplares de *S. minuta* fue descendiendo. Por

Resultados

último, las diferencias entre los puntos POL1 y POL2 fueron significativas en los periodos 2012 y 2013 ($p=0,0313$ y $p=0,0039$, respectivamente) (Tabla 16).

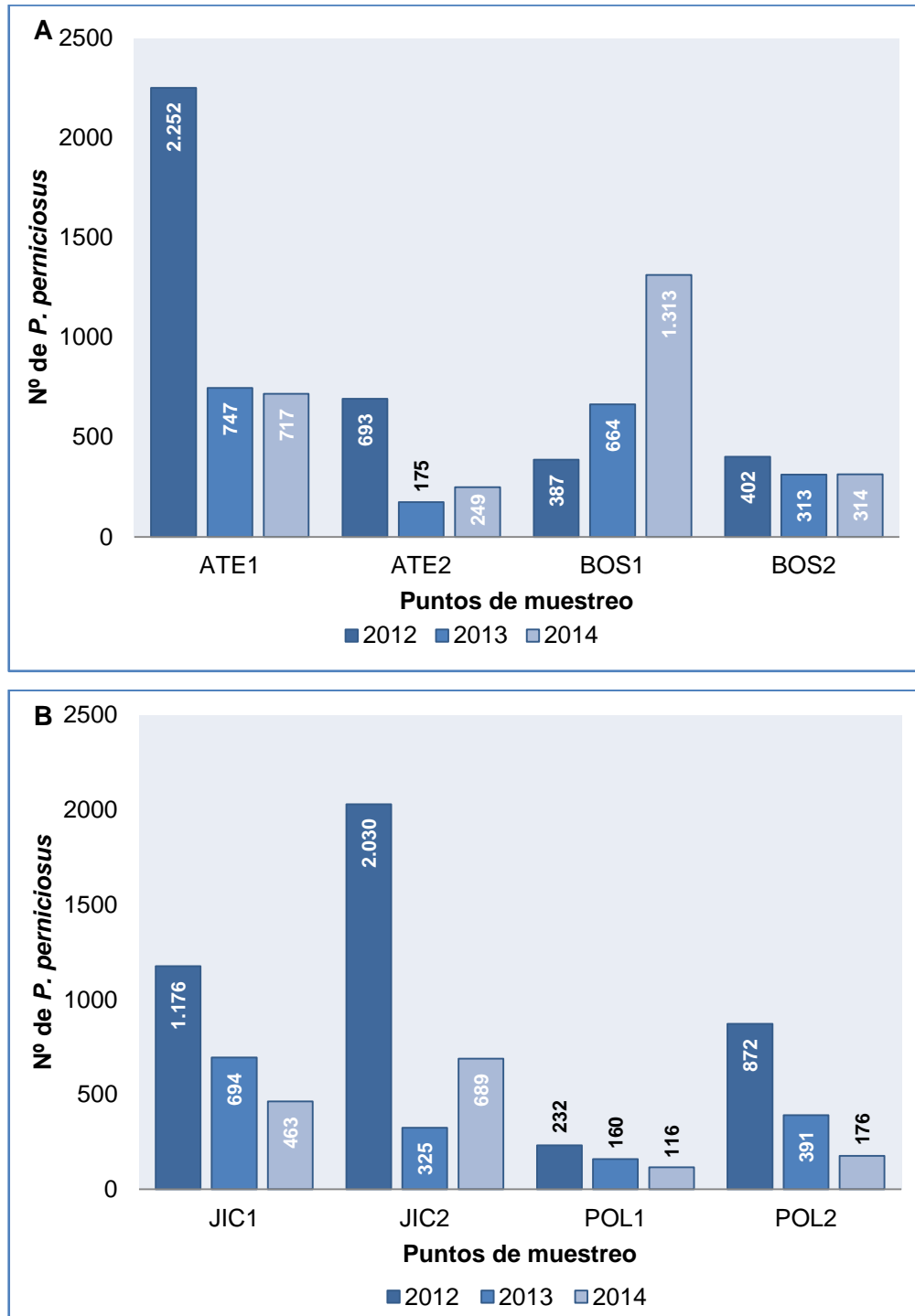


Figura 68. Número de ejemplares de *P. perniciosus* capturado a lo largo de los tres años del estudio en los dos puntos de las estaciones ATE y BOS **(A)** y en las estaciones JIC y POL **(B)**.

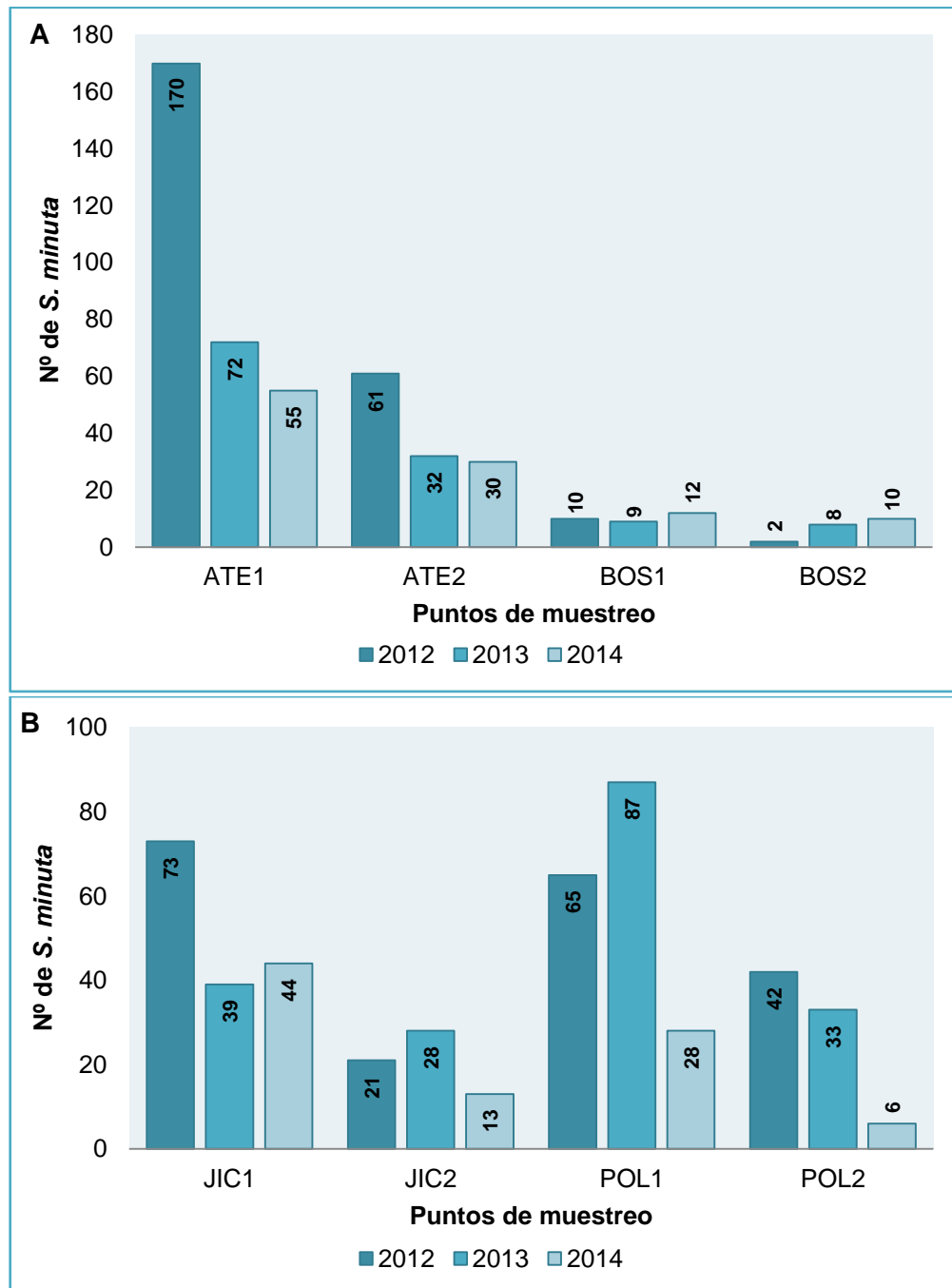


Figura 69. Número de ejemplares de *S. minuta* capturado a lo largo de los tres años del estudio en los dos puntos de muestreo de ATE y BOS **(A)** y de JIC y POL **(B)**.

Año	Estaciones			
	ATE	BOS	JIC	POL
2012	*0,0078	0,1250	0,0625	*0,0313
2013	0,1602	0,9999	0,4453	*0,0039
2014	0,0859	0,9999	*0,0078	0,1875

Tabla 16. Análisis de las diferencias anuales en las capturas de *S. minuta* entre los puntos de muestreo de cada estación (test no paramétrico de Wilcoxon). (*): $p < 0,05$.

4.3.4. Flebotomos capturados cada noche

Como se muestra en la Tabla 17, el número de ejemplares capturados mediante trampas de luz varió entre las dos noches de muestreo de cada mes. Se analizaron solamente las capturas de *P. perniciosus*, puesto que el número de *S. minuta* capturado mediante este tipo de trampas fue muy reducido. En el punto BOS1 no se capturó ningún flebotomo durante la primera noche (N1) en el mes de junio de 2012, debido a que la trampa se encontró apagada al ir a recogerla. Las diferencias en las capturas de cada noche fueron significativas en el mes de octubre de 2012 ($p=0,0076$) y de 2013 ($p=0,0376$) y en junio de 2014 ($p=0,0202$). En todos estos casos, el número de flebotomos capturados durante la segunda noche (N2) fue superior al número de capturas en N1: octubre 2012, N1 ($n=2$), N2 ($n=12$); octubre 2013, N1 ($n=30$), N2 ($n=88$); junio 2014, N1 ($n=104$), N2 ($n=621$).

Tabla 17. Capturas de *P. perniciosus* durante cada noche en los dos puntos de muestreo de cada estación a lo largo de los tres periodos del estudio. N1=primera noche; N2= segunda noche.

		Estaciones de muestreo															
		ATE1		ATE2		BOS1		BOS2		JIC1		JIC2		POL1		POL2	
Año	Mes	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2
2012	Jun	181	48	93	22	0	48	93	20	114	19	690	98	33	33	138	31
	Jul	45	38	17	9	52	148	126	51	318	175	154	583	28	72	135	176
	Ago	911	884	384	140	42	30	33	30	144	182	214	111	33	2	171	56
	Sep	115	25	24	1	36	31	11	37	188	35	140	40	10	20	55	107
	Oct	0	4	0	3	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	2	1
2013	Jun	1	33	5	10	4	1	5	1	3	29	3	12	1	5	5	8
	Jul	85	116	17	27	57	63	63	39	56	25	21	39	19	14	15	9
	Ago	26	92	10	10	39	82	33	28	43	74	59	68	19	15	64	68
	Sep	174	190	35	57	233	143	99	31	340	115	58	60	50	29	108	108
	Oct	13	17	0	4	12	30	0	14	0	9	0	5	5	3	0	6
2014	Jun	9	101	5	26	20	357	15	12	7	25	33	53	10	8	5	39
	Jul	117	84	14	23	113	90	28	26	92	19	66	24	5	13	10	5
	Ago	111	123	24	45	16	202	9	69	17	99	13	172	8	6	3	6
	Sep	30	83	24	53	169	305	72	73	44	110	66	244	31	26	93	11
	Oct	17	42	13	22	17	24	0	10	23	27	3	15	3	6	1	3

4.3.5. Abundancia relativa

La abundancia relativa total fue muy elevada para *P. perniciosus* (94.23%), seguida de *S. minuta* (5,75%) y *P. sergenti* (0,012%).

4.3.5.1. Abundancia relativa por periodo de muestreo

Los valores de abundancia relativa obtenidos durante los tres años son similares, superando *P. perniciosus* el 90% en todos ellos: 94,72% en 2012, 91,85% en 2013 y 95,37% en 2014. En el caso de *S. minuta*, fueron de 5,26% en 2012, 8,15% en 2013 y 4,63% en 2014. Los dos ejemplares de *P. sergenti* se capturaron en el año 2012, siendo

su abundancia relativa del 0,02%. No se encontraron diferencias significativas en las abundancias relativas de *P. perniciosus* ni de *S. minuta* entre los tres periodos de muestreo ($p=0,0853$ y $p=0,4441$, respectivamente).

4.3.5.2. Abundancia relativa por estación

En la Figura 70 se muestran las abundancias relativas en cada estación durante los tres periodos de muestreo. La mayor abundancia relativa de *P. perniciosus*, en detrimento de *S. minuta*, se encontró en la estación BOS. Por el contrario, la menor diferencia entre ambas especies se observó en la estación POL, aunque siguió siendo muy alta entre las dos especies de flebotomo. Estas diferencias en las abundancias relativas entre BOS y POL resultaron ser estadísticamente significativas ($p=0,0001$ y $p=0,0003$, para *P. perniciosus* y *S. minuta*, respectivamente). En las estaciones ATE y JIC, en el año 2012 se capturaron dos ejemplares de *P. sergenti*, un ejemplar en cada estación. En ambos casos, la abundancia relativa fue de 0,02%.

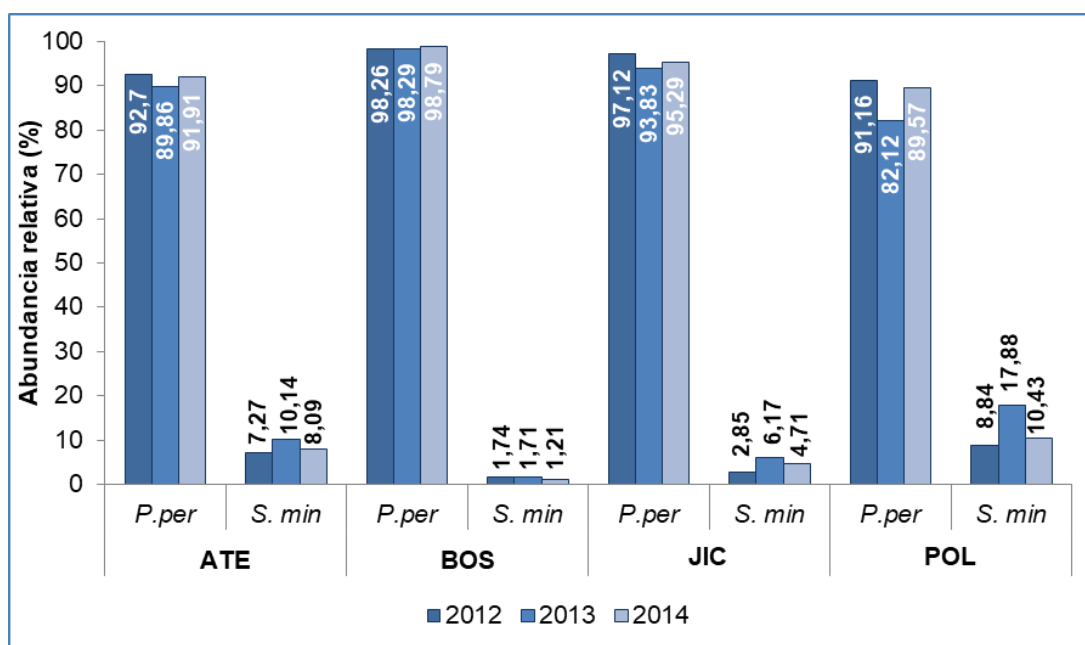


Figura 70. Abundancia relativa de *P. perniciosus* (*P. per*) y *S. minuta* (*S. min*) en cada estación a lo largo de cada año de muestreo.

4.3.6. Relación machos/hembras

La relación de machos frente a hembras en las capturas realizadas mediante trampas de luz fue del 53,13% en el caso de *P. perniciosus* y del 63,72% en el caso de *S. minuta*. En cuanto *P. sergenti*, los dos ejemplares capturados fueron hembras.

Esta relación varió a lo largo de los tres años de estudio. En el caso de *P. perniciosus*, en el año 2012 la relación machos/hembras fue menor (46,57%) que en los otros dos años, en los que la relación fue muy similar (2013, 60,10%; 2014, 57,40%). Por otro lado, la relación machos/hembras en *S. minuta* fue mayor en 2014, donde se alcanzó un 75% de machos, con respecto a los dos otros periodos (2012, 68%; 2013, 50,32%).

Resultados

Como se muestra en la Figura 71, el número de hembras y machos de *P. perniciosus* capturado también varió entre las cuatro estaciones de muestreo, aunque estas variaciones no fueron significativas ($p=0,0747$ y $p=0,2066$ para hembras y machos, respectivamente).

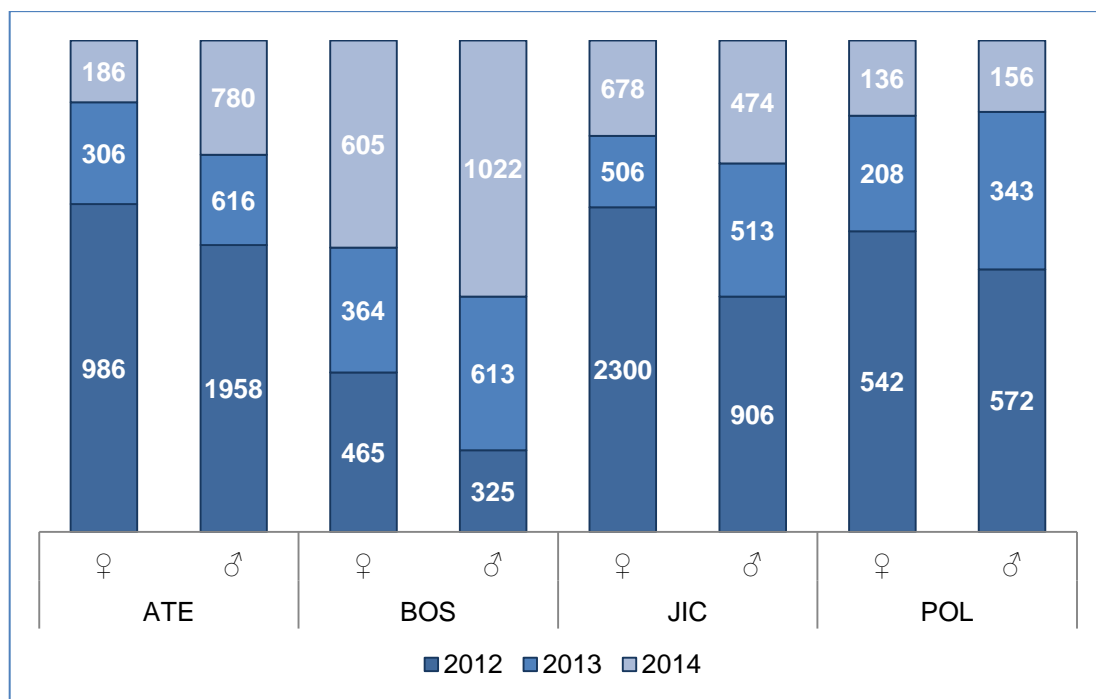


Figura 71. Número de hembras (♀) y machos (♂) de *P. perniciosus* en cada estación durante los tres periodos de muestreo.

Estos valores también variaron entre cada punto de muestreo (Figura 72). En el caso de la estación ATE se registró un mayor número de machos durante los tres años, siendo mayor la diferencia en el punto ATE2. En los dos puntos de muestreo de la estación BOS se capturaron más hembras en 2012, al contrario que en los otros dos periodos. En la estación JIC, se capturó un número mayor de hembras, excepto en el periodo 2013, ya que en el punto JIC1 se capturaron más machos. Por último, en el caso de la estación POL, el número de machos fue ligeramente superior en todos los periodos, con excepción de POL2 en 2014. El estudio estadístico no mostró que estas diferencias fueran significativas ($p>0,05$ en todos los casos).

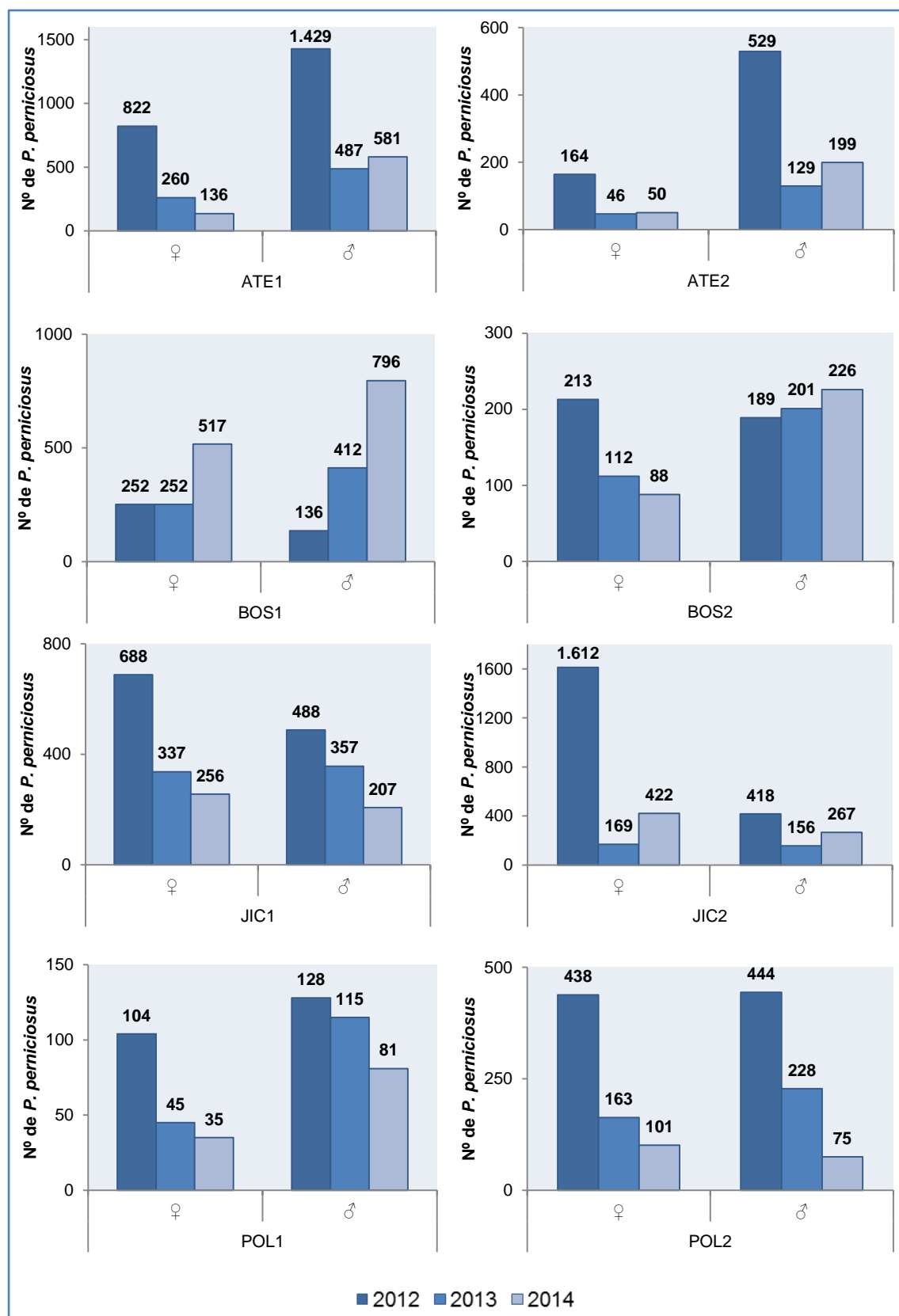


Figura 72. Hembras (♀) y machos (♂) de *P. perniciosus* capturados en cada punto de muestreo de las cuatro estaciones a lo largo de los tres años.

Resultados

En relación al número de hembras y machos de *S. minuta* capturado también varió en cada estación a lo largo de los tres periodos de muestreo, tal como se puede observar en la Figura 73. Se encontraron diferencias significativas al comparar el número de hembras capturadas entre las estaciones ($p=0,0174$); sin embargo, mediante el análisis múltiple de Dunn no se encontraron diferencias entre estaciones específicas. En el caso de los machos, las diferencias entre estaciones no fueron significativas ($p=0,0747$).

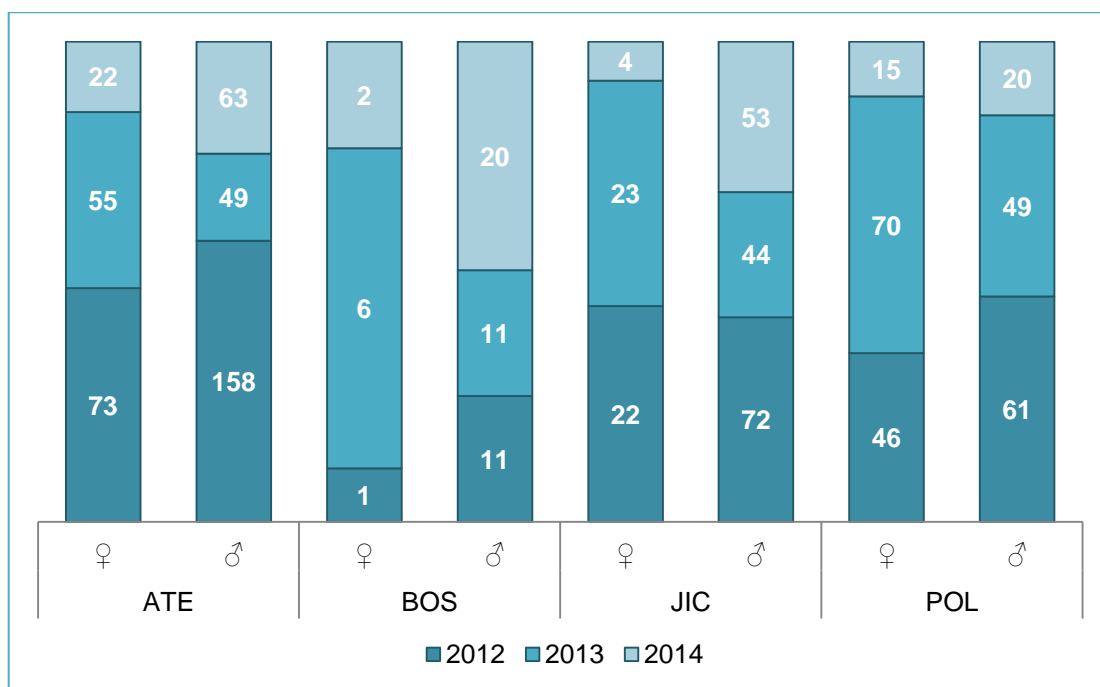


Figura 73. Número de hembras (♀) y machos (♂) de *S. minuta* capturado en cada estación a lo largo del estudio.

Como ocurrió con *P. perniciosus*, también se observaron diferencias en el número de hembras y machos de *S. minuta* registrado en los dos puntos de muestreo de cada estación (Figura 74). En ambos puntos de la estación ATE, el número de machos capturado fue mayor, excepto en ATE1 durante 2013. En ambos puntos de muestreo de la estación BOS, se capturó un mayor número de machos durante los tres periodos del estudio, al igual que en la estación JIC y POL, siendo esa diferencia mayor en JIC1. Finalmente, en la estación POL, nuevamente el número de machos fue superior, a excepción del punto POL1 durante 2013. En ningún periodo de muestreo las diferencias en el número hembras y machos capturado en los dos puntos de cada estación fueron significativas ($p>0,05$ en todos los casos).

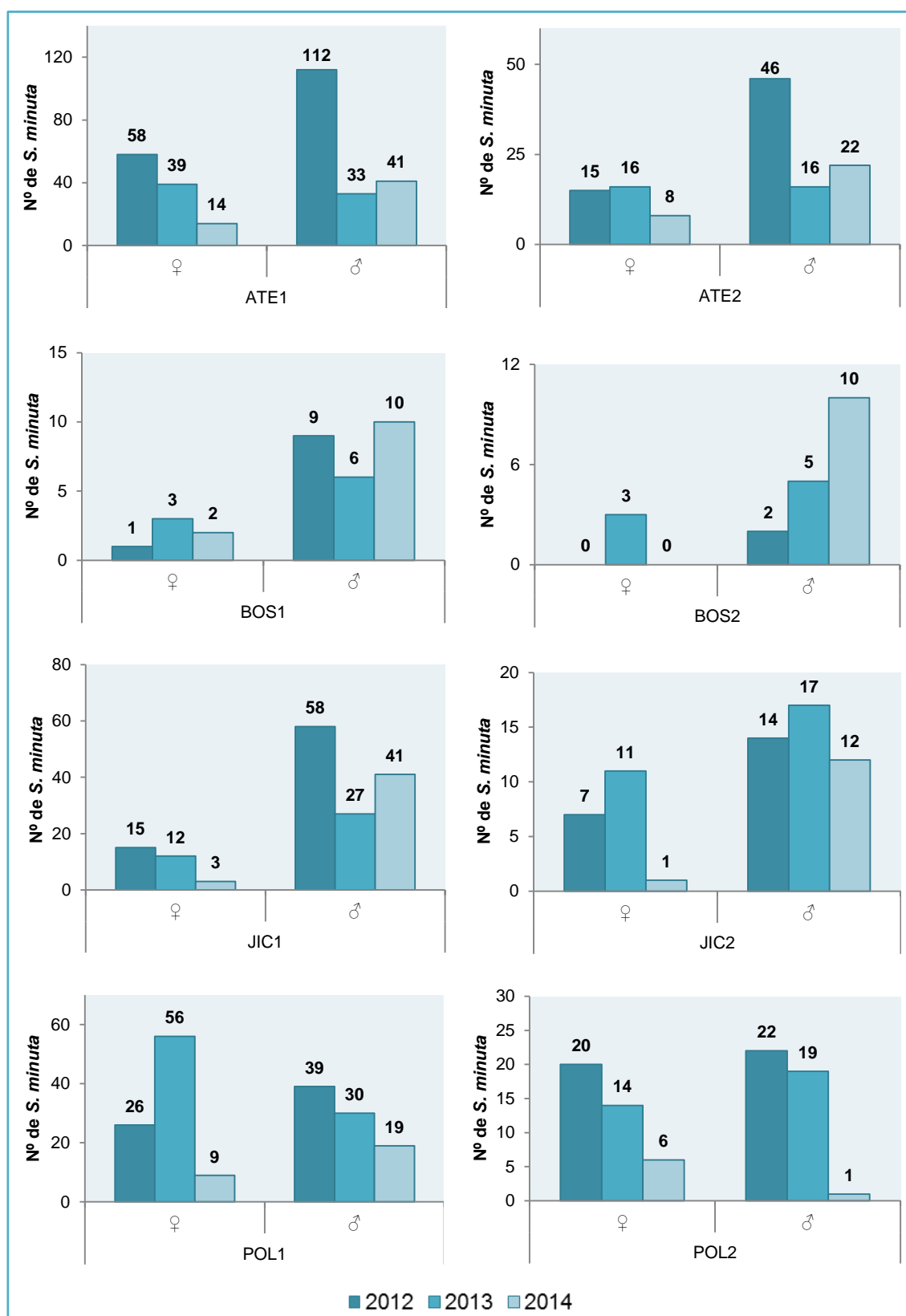


Figura 74. Número de hembras (♀) y machos (♂) de *S. minuta* capturado en cada punto de las cuatro estaciones de muestreo a lo largo del estudio.

4.4. Factores climáticos

A continuación se detallan los datos de temperatura y humedad relativa registrados con los *data loggers* colocados en cada punto de muestreo. Los datos analizados corresponden a los valores climáticos registrados entre el atardecer y el amanecer (ver Tabla 3 en Material y Métodos).

4.4.1. Temperatura

Los parámetros analizados en el estudio son los valores de temperatura media, temperatura máxima y temperatura mínima.

4.4.1.1. Temperatura media

Como se puede observar en la Figura 75 los valores de temperatura media más altos se alcanzaron en el mes de agosto de 2012 y de 2013, mientras que en el año 2014 se registraron en el mes de julio.

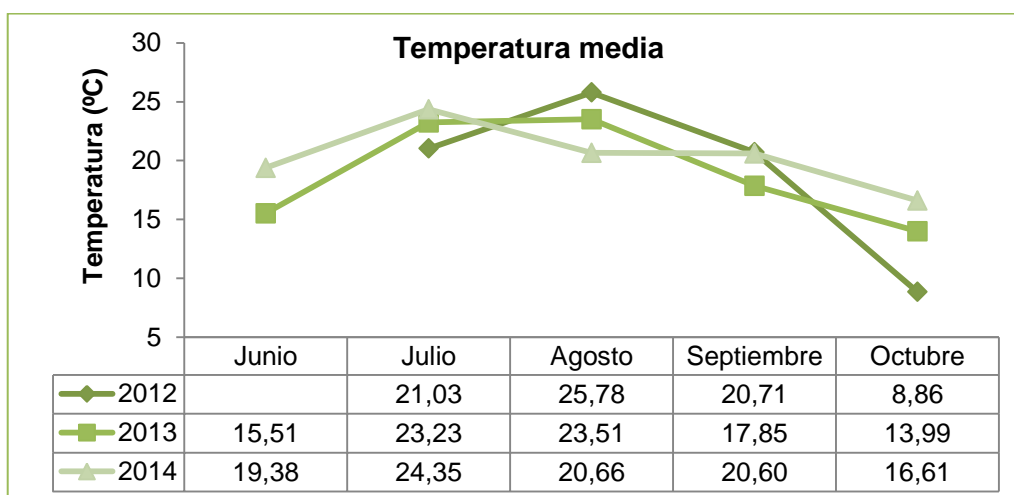


Figura 75. Temperatura media (°C) registrada mensualmente a lo largo de los tres periodos de muestreo.

El análisis estadístico mostró que las diferencias en los valores de temperatura media determinadas en cada periodo de muestreo no fueron significativas ($p=0,5380$). Tampoco se encontraron diferencias significativas al analizar los valores de temperatura media mensuales entre los tres periodos de muestreo ($p>0,05$ en todos los casos). Por otro lado, sí se observaron diferencias entre los valores de temperatura media registrados en cada estación de muestreo (Figura 76), resultando algunas de ellas significativas (Tabla 18). En junio de 2012 no se realizó comparación entre estaciones debido a que no se registraron datos con los *data loggers*. Al analizar los restantes meses de ese año, se encontraron diferencias significativas entre ATE y POL durante todos los meses (siendo los valores más altos en ATE), y entre JIC y POL en julio y octubre (con valores superiores de temperatura en JIC). En el año 2013 se encontraron diferencias

significativas entre ATE y BOS en julio, agosto y septiembre; y entre ATE y POL en el mes de octubre, siendo en ambos casos la temperatura más elevada en la estación ATE. Las diferencias entre ATE y POL fueron significativas en 2014 en los meses de julio y septiembre (con temperatura mayor en la estación ATE) (Tabla 19).

Año	Mes				
	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
2012		*0,0010	*0,0002	*0,0096	*<0,0001
2013	0,5345	*0,0039	*0,0045	*0,0005	*0,0078
2014	0,4171	*0,0005	0,1184	*0,0008	0,4239

Tabla 18. Valores p obtenidos tras el análisis de las temperaturas medias registradas mensualmente en las 4 estaciones de muestreo a lo largo del estudio (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$.

Tabla 19. Análisis de las diferencias entre las temperaturas medias registradas mensualmente cada año en las estaciones (test de comparación múltiple de Dunn). (*): $p < 0,05$.

Año	Estaciones	Mes				
		Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
2012	ATE vs. BOS	-	0,5258	0,3211	0,1554	0,3211
	ATE vs. POL	-	*0,0227	*0,0065	*0,0227	*0,0109
	ATE vs. JIC	-	>0,9999	>0,9999	0,9495	>0,9999
	BOS vs. POL	-	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	BOS vs. JIC	-	0,7133	>0,9999	>0,9999	0,6139
	POL vs. JIC	-	*0,0360	0,0694	0,8249	*0,0286
2013	ATE vs. BOS	>0,9999	*0,0451	*0,0286	*0,0286	0,1049
	ATE vs. POL	>0,9999	0,0561	0,0561	0,0694	*0,0451
	ATE vs. JIC	>0,9999	>0,9999	0,9495	>0,9999	>0,9999
	BOS vs. POL	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	BOS vs. JIC	>0,9999	0,5258	0,9495	0,1554	0,8249
	POL vs. JIC	>0,9999	0,6139	>0,9999	0,3211	0,4482
2014	ATE vs. BOS	>0,9999	0,0694	0,7117	0,0691	>0,9999
	ATE vs. POL	0,8249	*0,0286	0,1405	*0,0319	0,5258
	ATE vs. JIC	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	BOS vs. POL	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	BOS vs. JIC	>0,9999	0,3211	>0,9999	0,3485	>0,9999
	POL vs. JIC	>0,9999	0,1554	0,8232	0,1869	>0,9999

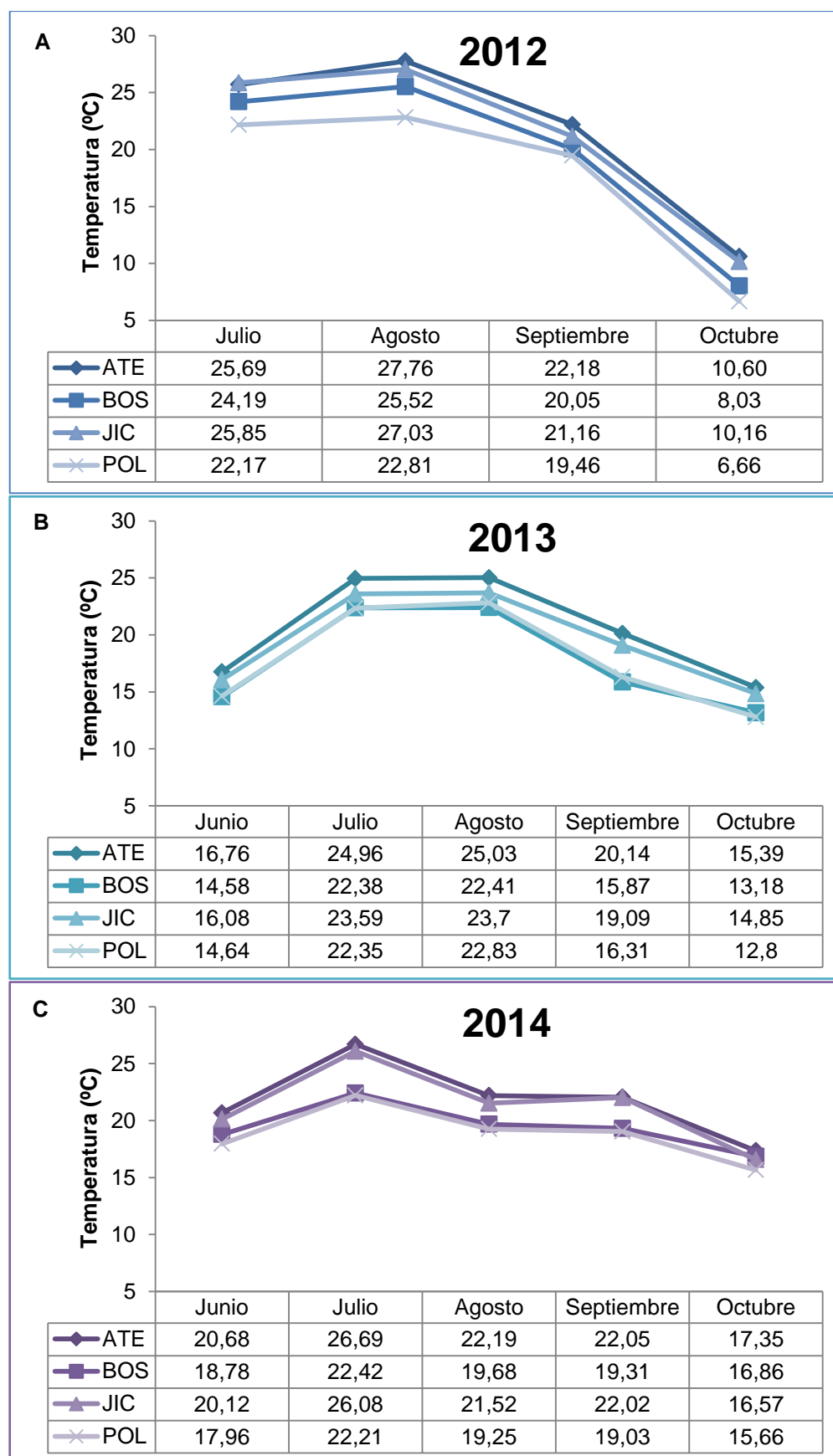


Figura 76. Temperatura media registrada en las cuatro estaciones cada año de muestreo. **A)** 2012, **B)** 2013, **C)** 2014.

Además, se estudió la variación de la temperatura media registrada entre las dos noches de muestreo de cada mes. Como se observa en la Tabla 20, las variaciones por lo general no fueron muy amplias, aun así se encontraron diferencias significativas en el mes de junio de 2013 ($p=0,0002$), en el que la temperatura media registrada en la segunda noche fue superior a la de la primera. Finalmente, en 2014 se encontraron diferencias significativas en los meses de junio ($p=0,0002$), agosto ($p=0,0112$) y octubre ($p=0,0002$). En el caso de junio y octubre, la temperatura media fue mayor en la segunda noche, mientras que en el mes de agosto sucedió lo contrario.

Tabla 20. Valores de temperatura media registrados durante cada noche en los dos puntos de muestreo de cada estación durante los tres periodos del estudio. N1: primera noche; N2: segunda noche.

Año	Mes	Puntos de muestreo															
		ATE1		ATE2		BOS1		BOS2		JIC1		JIC2		POL1		POL2	
		N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2
2012	Jul	25,58	26,15	25,34	25,68	24,71	24,70	24,34	22,98	23,27	21,84	22,46	21,13	26,37	27,51	24,83	24,67
	Ago	28,05	27,84	27,47	27,69	24,99	26,41	24,74	25,93	23,40	23,01	22,62	22,19	28,62	26,81	27,04	25,64
	Sep	22,34	22,62	21,21	22,57	19,30	21,43	18,45	21,02	18,63	20,97	17,81	20,42	21,15	21,97	20,41	21,09
	Oct	10,68	12,01	9,63	10,05	7,97	7,82	8,20	8,10	7,23	6,82	6,67	5,89	10,13	11,37	9,15	9,98
2013	Jun	14,76	18,72	14,89	18,67	12,70	16,06	13,57	16	13,36	16,64	12,94	15,60	14,54	19,01	13,08	17,68
	Jul	24,34	25,34	23,73	25,07	22,12	23,14	21,80	22,45	22,52	23,27	21,62	22	23,48	24,46	22,46	23,93
	Ago	24,72	25,55	24,55	25,31	23,14	23,19	21,69	22,26	22,59	23,50	22,14	23,05	23,31	24,70	22,91	23,55
	Sep	20,16	20,85	19,22	20,34	15,39	17,05	15,10	15,93	15,82	17,83	15,16	16,44	20,39	19,45	18,09	18,43
	Oct	15,37	16,17	15	15,03	14,12	12,35	13,99	12,23	13,65	12,43	13,52	11,59	15,02	15,76	14,30	13,33
2014	Jun	18,61	23,13	18,57	22,40	17,33	20,45	17,18	20,13	16,60	20,57	15,46	19,20	18,42	23,36	17,34	21,37
	Jul	27,37	27,54	25,95	25,91	23,03	22,32	22,72	21,62	22,70	22,95	21,64	21,52	27,10	27,17	25,30	24,74
	Ago	22,04	21,95	23,72	21,06	21,94	16,94	21,95	17,86	21,43	18,41	20,47	16,67	22,91	21,81	21,73	19,61
	Sep	22	22,86	21,49	21,86	19,03	19,80	18,85	19,56	19,94	19,45	18,48	18,27	21,11	25,81	19,94	21,20
	Oct	16,36	18,16	16,60	18,28	15,79	17,72	16,06	17,83	14,44	17,20	13,90	17,10	16,09	17,79	15,23	17,16

4.4.1.2. Temperatura máxima

En el caso de las temperaturas máximas, el valor medio más alto fue registrado en el mes de agosto de 2012; mientras que en 2013 y 2014, se registró en julio, tal y como se muestra en la Figura 77.

Las diferencias en el promedio de los valores de temperaturas máximas registrados entre los periodos de muestreo no fueron significativas ($p=0,9131$), sin embargo sí se encontraron diferencias significativas entre los meses, a excepción del mes de septiembre (Tabla 21). El análisis de comparación múltiple mostró diferencias significativas entre los meses de agosto y octubre de 2012, frente a 2013 y 2014 (Tabla 22). Concretamente, la temperatura registrada en agosto de 2012 fue superior a los otros dos años; mientras que en el mes de octubre de 2012 la temperatura fue menor a los otros dos periodos de muestreo, como se puede comprobar en la Figura 77.

Resultados

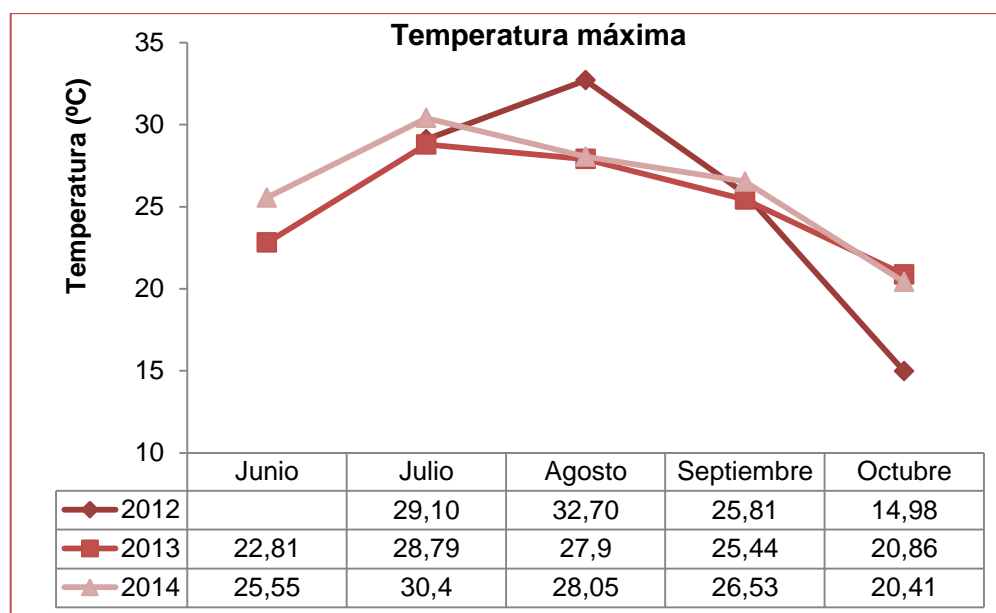


Figura 77. Evolución de los valores medios de temperaturas máximas registrados en cada periodo de muestreo.

En la Figura 78 se representa la evolución de los valores de temperatura máxima registrados en cada estación a lo largo de los tres años del estudio. En el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre los valores de temperatura máxima registrados en todas las estaciones en agosto de 2012 y 2013, y en septiembre de los tres años (Tabla 23). No obstante, el análisis de comparación múltiple no mostró diferencias significativas entre estaciones concretas ($p > 0,05$ en todos los casos).

Mes	Valor p
Junio	*0,0002
Julio	*0,0468
Agosto	*0,0007
Septiembre	0,0621
Octubre	*0,0003

Tabla 21. Análisis de las diferencias en los valores medios de temperatura máxima mensuales entre los tres periodos de muestreo (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$.

Año	Mes			
	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
2012 vs. 2013	> 0,9999	*0.0016	> 0,9999	*0.0003
2012 vs. 2014	0.2395	*0.0055	0.4546	*0.0111
2013 vs. 2014	0.0508	> 0,9999	0.0584	0.9642

Tabla 22. Valores p resultantes tras el análisis de las diferencias entre las temperaturas máximas medias registradas mensualmente, comparadas por años (test de comparación múltiple de Dunn). (*): $p < 0,05$.

Año	Mes				
	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
2012	-	0,2667	*0,0286	*0,0190	0,0667
2013	0,0667	0,1333	*0,0476	*0,0095	0,0857
2014	0,1143	0,1238	0,0762	*0,0095	0,1333

Tabla 23. Resultados de los valores p tras analizar las diferencias entre las temperaturas máximas promedio mensuales de las estaciones (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$.

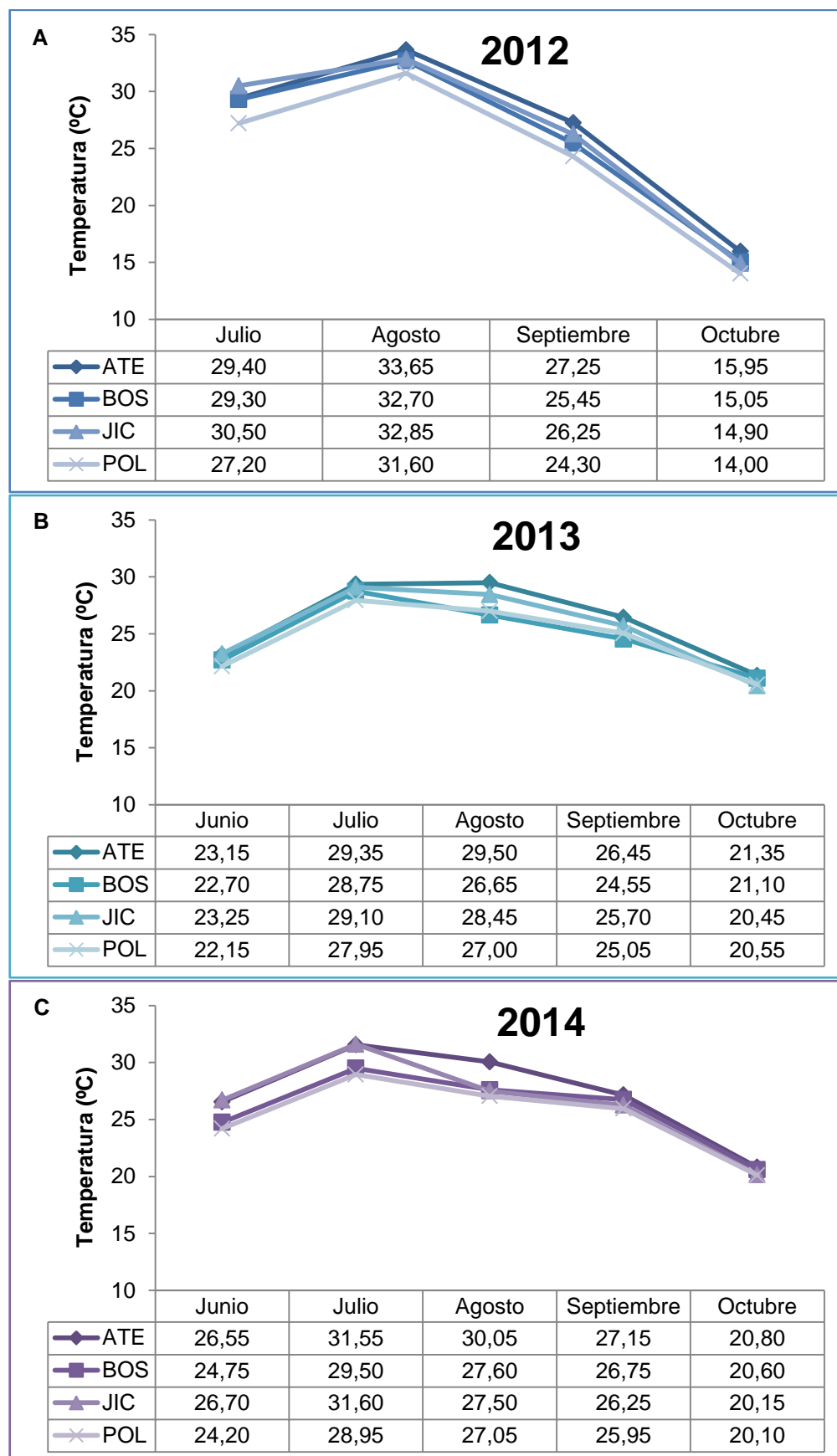


Figura 78. Temperatura máxima media registrada en cada estación durante cada periodo de muestreo. **A) 2012, B) 2013, C) 2014.**

4.4.1.3. Temperatura mínima

En relación con las temperaturas mínimas medias observadas en cada periodo de muestreo, se puede observar en la Figura 79 que el valor más bajo del año 2013 fue registrado en junio y no en octubre, como sucedió en los otros dos periodos. Así mismo, en 2014 las temperaturas mínimas del mes de agosto fueron inferiores a las registradas en el mes de septiembre.

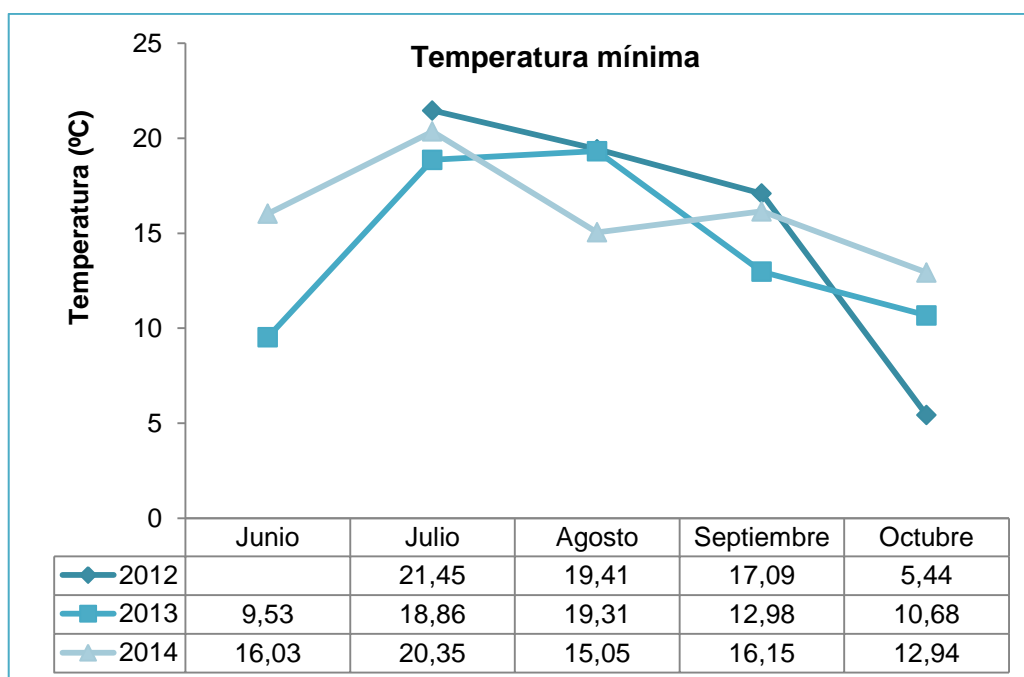


Figura 79. Evolución de los valores de temperatura mínima registrados a lo largo de los tres periodos de muestreo.

El estudio estadístico encontró que los valores globales entre periodos no fueron significativamente diferentes ($p=0,8151$), mientras que sí existieron diferencias significativas entre todos los meses de los tres periodos del estudio (Tabla 24). Las diferencias entre temperaturas mínimas medias registradas en 2012 y 2013 fueron significativas entre todos los meses (Tabla 25), a excepción de agosto, siendo mayor la temperatura registrada en 2012 en julio y septiembre, y menor en octubre (Figura 79). Entre 2012 y 2014 se hallaron diferencias significativas en agosto y octubre, siendo mayor la temperatura en 2012 en ambos meses (Tabla 25). Las diferencias entre los datos registrados en 2013 y 2014 no fueron significativas (Tabla 25).

Mes	Valor p
Junio	*0,0002
Julio	*0,0358
Agosto	*0,0031
Septiembre	*0,0063
Octubre	*0,0001

Tabla 24. Análisis de las diferencias en los valores medios de temperatura mínima mensuales entre los tres periodos de muestreo (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$.

Año	Mes			
	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
2012 vs. 2013	*0,0309	>0,9999	*0,0052	*0,0252
2012 vs. 2014	0,8896	*0,0079	0,8659	*<0,0001
2013 vs. 2014	0,3843	0,0118	0,1156	0,3846

Tabla 25. Valores p obtenidos tras el análisis de las diferencias entre las temperaturas mínimas registradas mensualmente en las estaciones, comparando los tres años de muestreo (test de comparación múltiple de Dunn). (*): $p < 0,05$.

En la Figura 80 se presentan los valores medios de temperatura mínima registrados en cada estación a lo largo de cada periodo del estudio. Como se muestra en la Tabla 26, estos valores presentan diferencias significativas en los meses de agosto y septiembre de 2012, y desde junio a septiembre de 2013. Sin embargo, en el año 2014 no se observaron diferencias significativas. El análisis de comparación múltiple de Dunn no evidenció diferencias específicas entre estaciones concretas ($p > 0,05$ en todos los casos).

Año	Mes				
	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
2012		0,1619	*0,0190	*0,0381	0,0762
2013	*0,0381	*0,0381	*0,0381	*0,0476	0,0857
2014	0,0857	0,1143	0,1143	0,0667	0,0667

Tabla 26. Valores p resultantes tras el estudio estadístico de las diferencias en las temperaturas mínimas promedio registradas mensualmente en las estaciones a lo largo de los tres periodos de muestreo (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$.

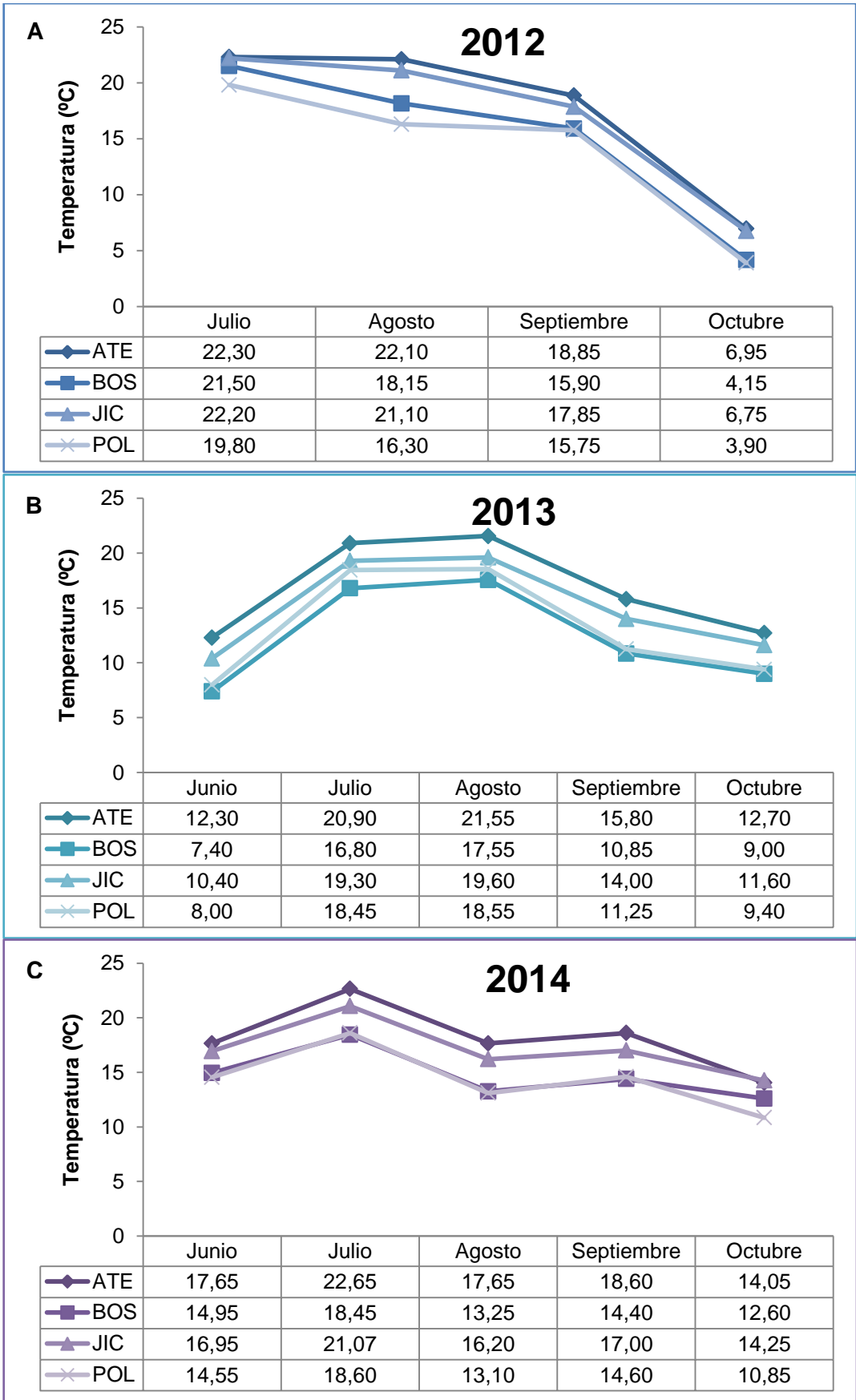


Figura 80. Valores medios de temperatura mínima registrados en cada estación durante cada periodo del muestreo. **A) 2012, B) 2013, C) 2014.**

4.4.2. Humedad relativa

Al igual que con los valores de temperatura, se ha estudiado la humedad relativa media, la humedad relativa máxima y la humedad relativa mínima.

4.4.2.1. Humedad relativa media

Como se puede observar en la Figura 81, el valor de humedad relativa media más bajo de los años 2012 y 2013 fue registrado en el mes de agosto, mientras que en el año 2014 fue en el mes de julio. Por otro lado, el valor más alto fue registrado en el mes de octubre en los tres años estudiados. Las diferencias de los valores de humedad relativa media registrados en los tres periodos no fueron estadísticamente significativas ($p=0,4969$).

Tampoco fueron significativas las variaciones en los valores de humedad relativa media entre los meses de cada periodo de muestreo, a excepción de junio de 2013 y 2014, siendo inferior el valor registrado en 2013 ($p=0,0286$) ($p>0,05$ en el resto de casos).

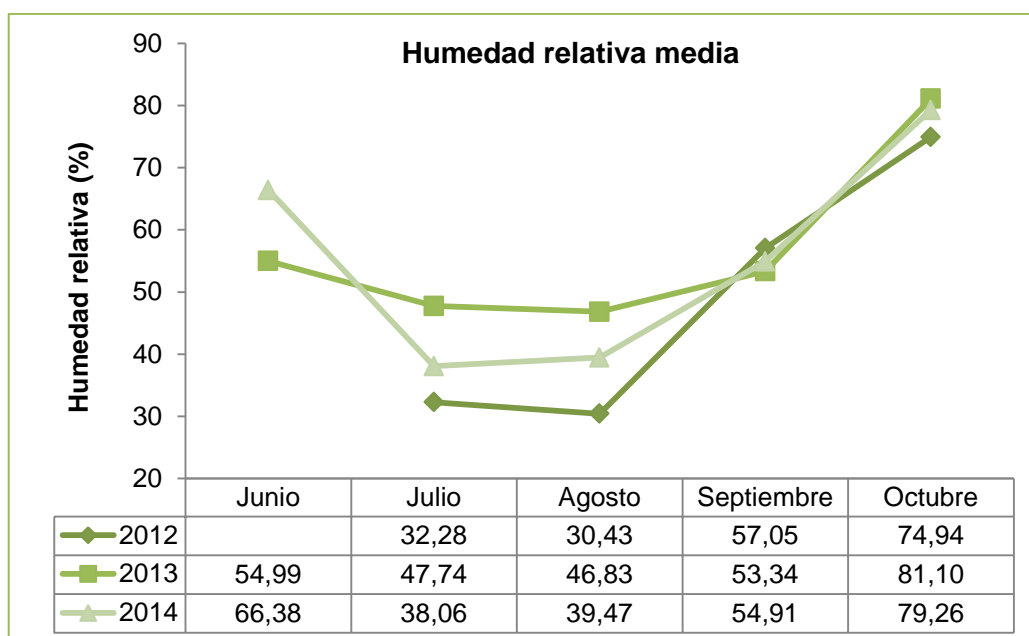


Figura 81. Evolución de los valores de humedad relativa media a lo largo de cada periodo de muestreo.

En relación a los valores de humedad relativa media registrados en las cuatro estaciones de muestreo, se encontraron diferencias a lo largo de los tres años, tal como se muestra en la Figura 82. Estas diferencias fueron significativas en los meses de julio, agosto, septiembre y octubre (Tabla 27). Concretamente, en el año 2012 se encontraron diferencias significativas entre las estaciones ATE y POL, en los meses de agosto y octubre; y entre las estaciones JIC y POL, en los meses de julio, agosto y octubre. En todos los meses mencionados la humedad relativa fue mayor en la estación POL. En el año 2013, la humedad relativa en la estación ATE mostró diferencias significativas frente a BOS en el mes de agosto y frente a POL en agosto, septiembre y octubre; siendo en todos los casos el valor de humedad relativa menor en ATE. Finalmente, en 2014 se

Resultados

hallaron diferencias significativas entre los valores obtenidos en las estaciones ATE y POL, en septiembre; y entre JIC y POL, en julio y septiembre, registrándose los valores más altos en esta última (Tabla 28).

Año	Mes				
	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
2012		*0,0001	*0,0046	0,1848	*0,0001
2013	0,4784	*0,0348	*0,0002	*0,0006	*0,0031
2014	0,4104	*0,0008	0,4603	*0,0006	0,3490

Tabla 27. Resultado de los valores p tras el análisis de las diferencias entre la humedad relativa media registrada mensualmente a lo largo de los tres periodos de muestreo (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$.

Tabla 28. Valores p obtenidos tras estudiar las diferencias entre los valores de humedad relativa media registrados mensualmente en las estaciones, durante cada periodo de muestreo (test de comparación múltiple de Dunn). (*): $p < 0,05$.

Año	Estaciones	Mes				
		Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
2012	ATE vs. BOS		0,7133	>0,9999	0,9495	0,3803
	ATE vs. POL		0,1876	*0,0451	0,2255	*0,0220
	ATE vs. JIC		>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	BOS vs. POL		>0,9999	0,9495	>0,9999	>0,9999
	BOS vs. JIC		0,0561	>0,9999	>0,9999	0,3803
	POL vs. JIC		*0,0084	*0,0360	0,9495	*0,0227
2013	ATE vs. BOS	>0,9999	0,2051	*0,0178	0,0561	0,4482
	ATE vs. POL	0,9495	0,1405	*0,0227	*0,0360	*0,0178
	ATE vs. SJIC	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	BOS vs. POL	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	BOS vs. JIC	>0,9999	0,6605	0,5258	0,2697	>0,9999
	POL vs. JIC	>0,9999	0,4844	0,6139	0,1876	0,1049
2014	ATE vs. BOS	>0,9999	0,2255	>0,9999	0,2255	>0,9999
	ATE vs. POL	0,8249	0,1049	>0,9999	*0,0451	0,3803
	ATE vs. JIC	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	BOS vs. POL	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	BOS vs. JIC	>0,9999	0,1049	>0,9999	0,2255	>0,9999
	POL vs. JIC	>0,9999	*0,0451	0,7133	*0,0451	>0,9999

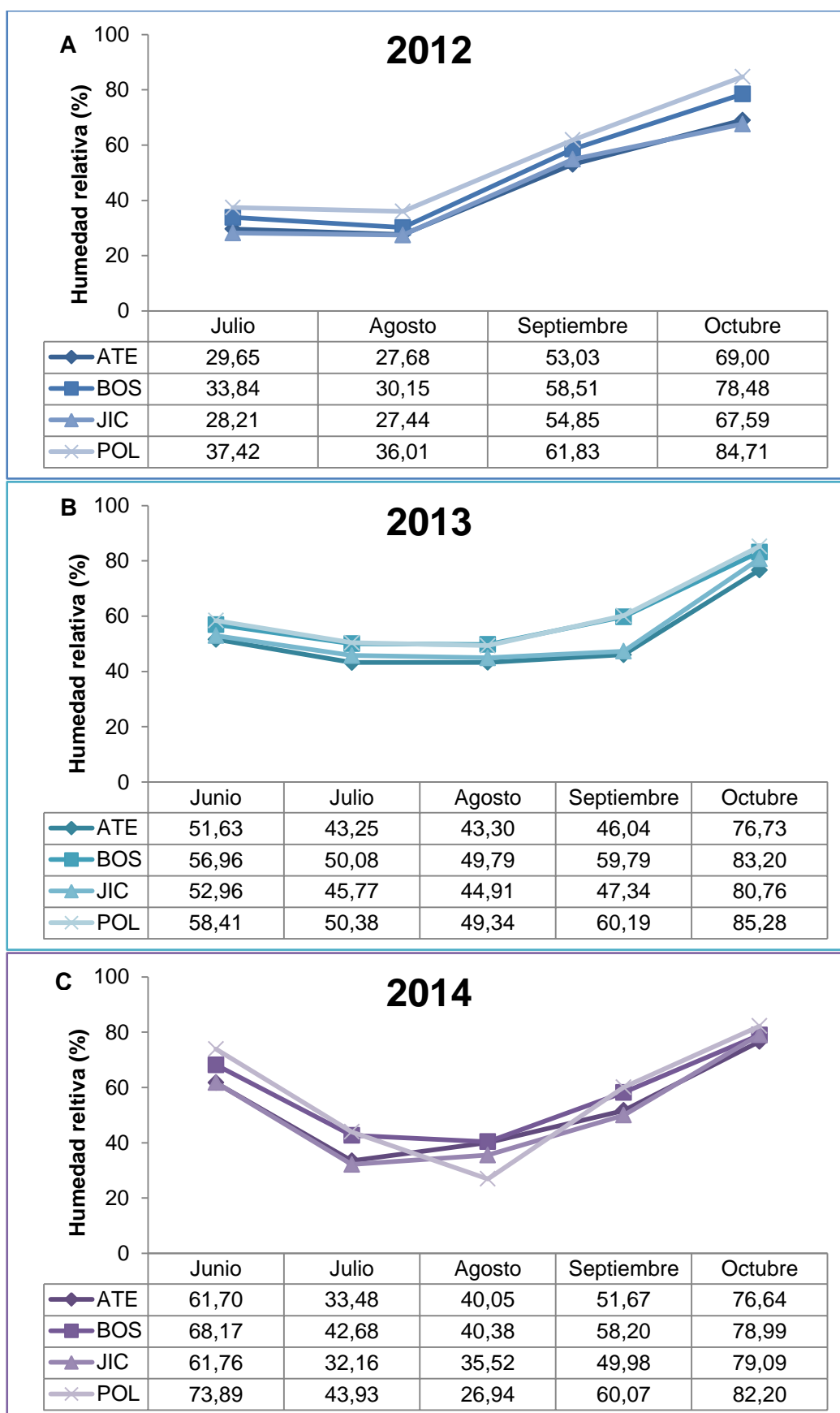


Figura 82. Valores de humedad relativa media registrados en las estaciones durante cada año de muestreo. **A) 2012, B) 2013, C) 2014.**

Resultados

También se estudiaron las diferencias en los valores de humedad relativa media registrados cada noche de muestreo a lo largo de los tres años (Tabla 29). En el año 2012, sólo se encontraron diferencias significativas en septiembre ($p=0,0011$), siendo los valores registrados más altos en la segunda noche. En 2013, se registraron diferencias significativas en junio ($p=0,0002$) y julio ($p=0,0274$), meses en los que el valor de humedad relativa media fue mayor en la primera noche. En el caso del año 2014, fueron tres los meses que mostraron diferencias significativas: junio ($p=0,002$), cuyos valores registrados fueron superiores en la primera noche; agosto ($p=0,0019$) y octubre ($p=0,0003$), en los que la humedad relativa media fue mayor en la segunda noche de muestreo (Tabla 29).

Tabla 29. Valores de humedad relativa media registrada durante cada noche en los puntos de muestreo de cada estación a lo largo del estudio. N1: noche 1; N2: noche 2.

Año	Mes	Puntos de muestreo															
		ATE1		ATE2		BOS1		BOS2		JIC1		JIC2		POL1		POL2	
		N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2
2012	Jul	28,98	29,38	30,13	30,12	30,79	33,97	31,30	39,29	33,36	38,82	36,16	41,53	28,22	27,12	28,19	29,32
	Ago	28,14	26,84	29,06	26,68	31,79	27,83	34,45	28,30	37,21	33,88	38,45	34,50	27,38	28,53	26,79	27,04
	Sep	46,24	58,76	48,16	58,96	52,61	62,22	55,84	63,36	57,19	63,29	60,83	65,98	49,60	61,21	48,23	60,34
	Oct	67,80	65,30	71,84	74,03	75,72	79,68	77,07	81,46	81,44	87,34	81,82	88,22	67,14	67,55	66,59	69,08
2013	Jun	59,68	42,70	60,29	43,85	66,33	47,84	64,02	49,62	65,35	49,54	67,18	51,56	62,26	41,12	64,15	43,29
	Jul	45,88	42,60	47,36	43,14	51,23	46,89	52,73	49,48	50,38	47,33	52,91	50,89	48,25	44,71	47,49	42,60
	Ago	42,64	43,02	43,67	43,85	46,89	47,81	51,52	51,92	47,45	48,95	50,03	50,94	46,92	45,35	44,04	44,33
	Sep	44,42	45,09	48,15	46,48	58,48	55,40	63,94	61,33	62,68	54,45	64,16	59,47	43,58	49,12	48,47	48,19
	Oct	78,83	71,16	81,16	75,74	84,56	80,81	85,16	82,28	85,51	83,17	86,64	85,79	83,16	75,41	82,23	75,93
2014	Jun	74,01	48,32	73,72	50,74	79,95	54,64	81,47	56,64	85,44	55,90	93,37	60,83	75,40	47,16	75,97	48,49
	Jul	33,71	30,04	36,52	33,67	41,35	39,25	44,25	45,85	44,07	41,84	45,53	44,28	34,90	29,83	34,11	29,79
	Ago	45,00	43,50	27,39	44,32	29,57	52,58	28,91	50,46	29,31	51,51	30,91	56,04	28,67	42,89	27,08	43,43
	Sep	51,31	50,04	52,53	51,62	59,20	56,47	60,62	56,52	57,68	58,45	62,58	61,57	54,52	41,38	54,08	49,95
	Oct	72,60	81,80	71,46	80,69	75,34	82,82	74,68	83,11	79,33	84,40	80,86	84,77	76,47	83,54	74,89	81,46

4.4.2.2. Humedad relativa máxima

En la Figura 83 se representan los valores medios de humedad relativa máxima. Se puede observar como los valores inferiores fueron registrados en julio, tanto en 2012 como en 2014; mientras que en 2013 se registraron en agosto. Además, los valores más altos se volvieron a dar en octubre en los tres periodos de muestreo. Los valores de humedad relativa máxima no presentaron diferencias significativas entre los diferentes periodos ($p=0,6095$).

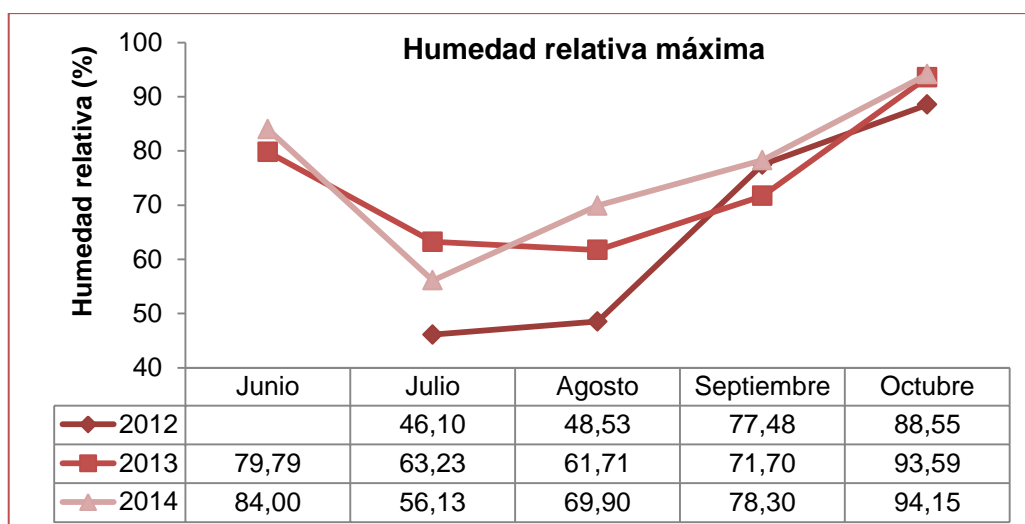


Figura 83. Evolución de los valores de humedad relativa máxima a lo largo de cada periodo de muestreo.

En relación a los valores de humedad recogidos en junio de 2013 y junio de 2014 no se encontraron diferencias significativas ($p=0,3282$). En cambio, sí se encontraron entre los valores registrados en julio de 2012 y 2013, siendo inferiores en 2012; y entre agosto de 2012, 2013 y 2014, volviendo a ser inferiores en 2012 (Tabla 30).

Año	Mes			
	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
2012 vs. 2013	*0,0003	*0,0441	>0,9999	0,1978
2012 vs. 2014	0,0588	*0,0001	>0,9999	0,0646
2013 vs. 2014	0,3346	0,2691	0,7078	>0,9999

Tabla 30. Valores p obtenidos tras analizar los datos promedio de humedad relativa máxima registrados mensualmente entre cada periodo de muestreo (test de comparación múltiple de Dunn). (*): $p<0,05$.

Los datos de humedad relativa máxima variaron entre las cuatro estaciones a lo largo del estudio (Figura 84). El análisis estadístico mostró diferencias significativas en agosto y septiembre de 2012, en julio y septiembre de 2013, y en junio y julio de 2014 (Tabla 31). En todos estos casos, se observó que la estación con el valor más bajo de humedad relativa máxima se dio en la estación ATE, mientras que el valor más alto se observó en la estación POL. Sin embargo, el análisis de comparación múltiple mostró que estas diferencias no son significativas ($p>0,05$ en todos los casos).

Año	Mes				
	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
2012		0,0667	*0,0095	*0,0381	0,1143
2013	0,1143	*0,0095	0,1143	*0,0095	*0,0476
2014	*0,0095	*0,0095	0,0667	0,1238	0,1143

Tabla 31. Valores p resultantes tras el análisis de las diferencias en la humedad relativa máxima registrada mensualmente en las estaciones a lo largo de cada periodo (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). (*): $p<0,05$.

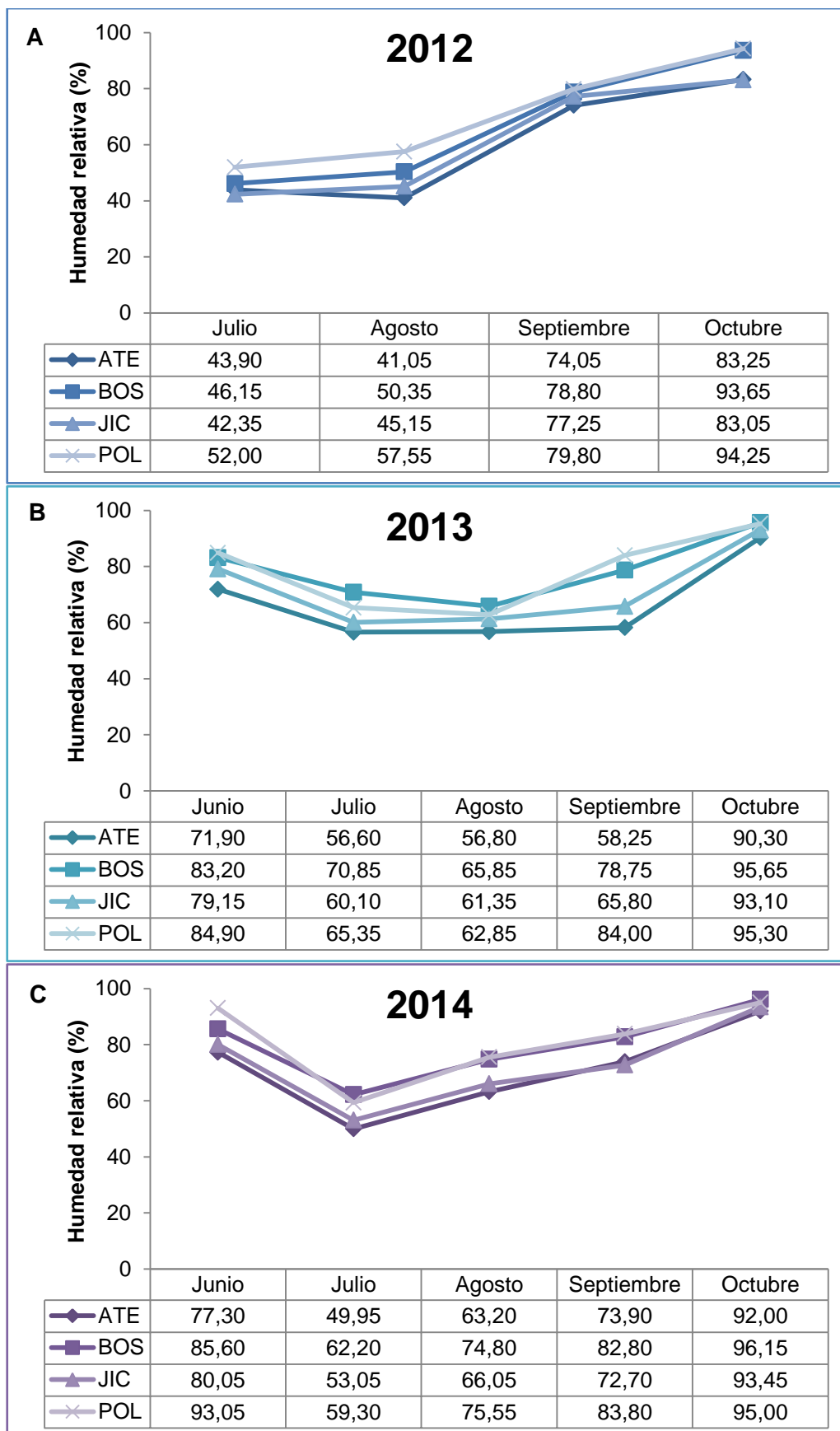


Figura 84. Valores medios de humedad relativa máxima registrados en las estaciones a lo largo de cada año de muestreo. **A) 2012, B) 2013, C) 2014.**

4.4.2.3. Humedad relativa mínima

En relación a los valores medios de humedad relativa mínima, en la Figura 85 se puede comprobar que los valores inferiores se registraron en agosto de 2012 y 2014, y en julio de 2013; mientras que los más altos se volvieron a registrar en octubre. Las diferencias observadas entre los valores de los tres periodos de muestreo no fueron significativas ($p=0,8736$).

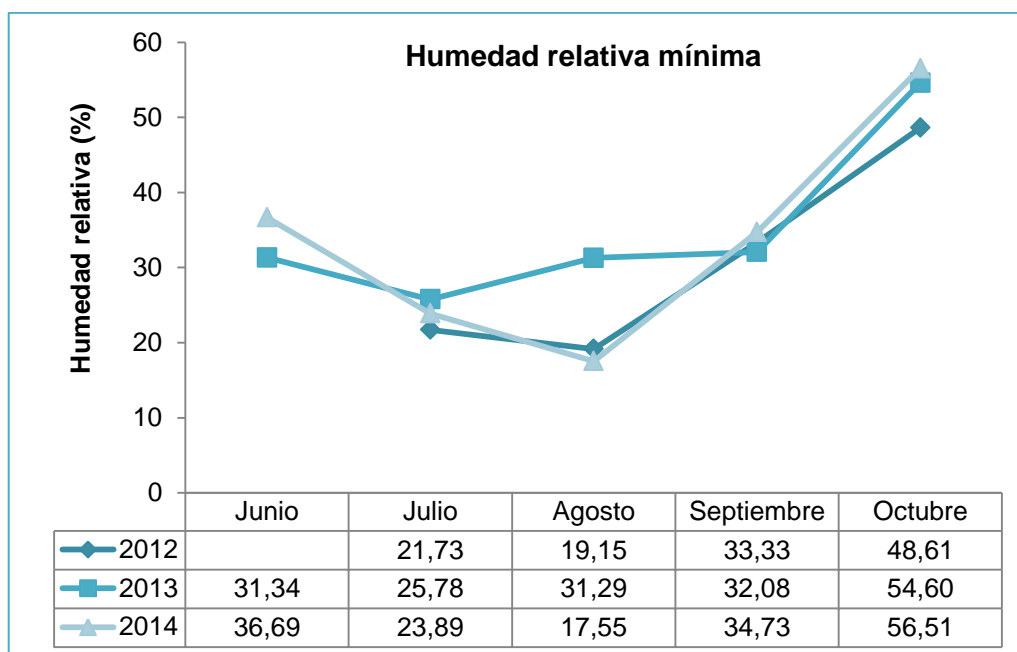


Figura 85. Evolución mensual de los registros de humedad relativa mínima en cada periodo de muestreo.

El análisis de los valores mensuales entre los periodos de muestreo no mostró diferencias significativas entre junio de 2013 y junio de 2014 ($p=0,1304$), pero sí entre julio de 2012 y de 2013, siendo inferior en 2012; entre agosto de 2012-2013 y 2013-2014, con el valor registrado en 2013 superior a los otros dos años; y entre octubre de 2012 y los otros dos años, siendo inferior en 2012 (Tabla 32).

Año	Mes			
	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
2012 vs. 2013	*0,0360	*0,0216	>0,9999	*0,0194
2012 vs. 2014	>0,9999	0,4716	0,6084	*0,0001
2013 vs. 2014	0,3460	*0,0001	0,2397	0,5370

Tabla 32. Resultado de los valores p tras estudiar las diferencias en los datos promedio de humedad relativa mínima registrados mensualmente entre de cada periodo de muestreo (test de comparación múltiple de Dunn). (*): $p<0,05$.

Por otro lado, se observaron diferencias en los valores de humedad relativa mínima recogidos en las estaciones de muestreo (Figura 86), siendo significativas en junio de 2014 ($p=0,0381$), aunque el análisis de comparación múltiple no detectó diferencias significativas entre estaciones en concreto ($p>0,05$ en todos los casos).

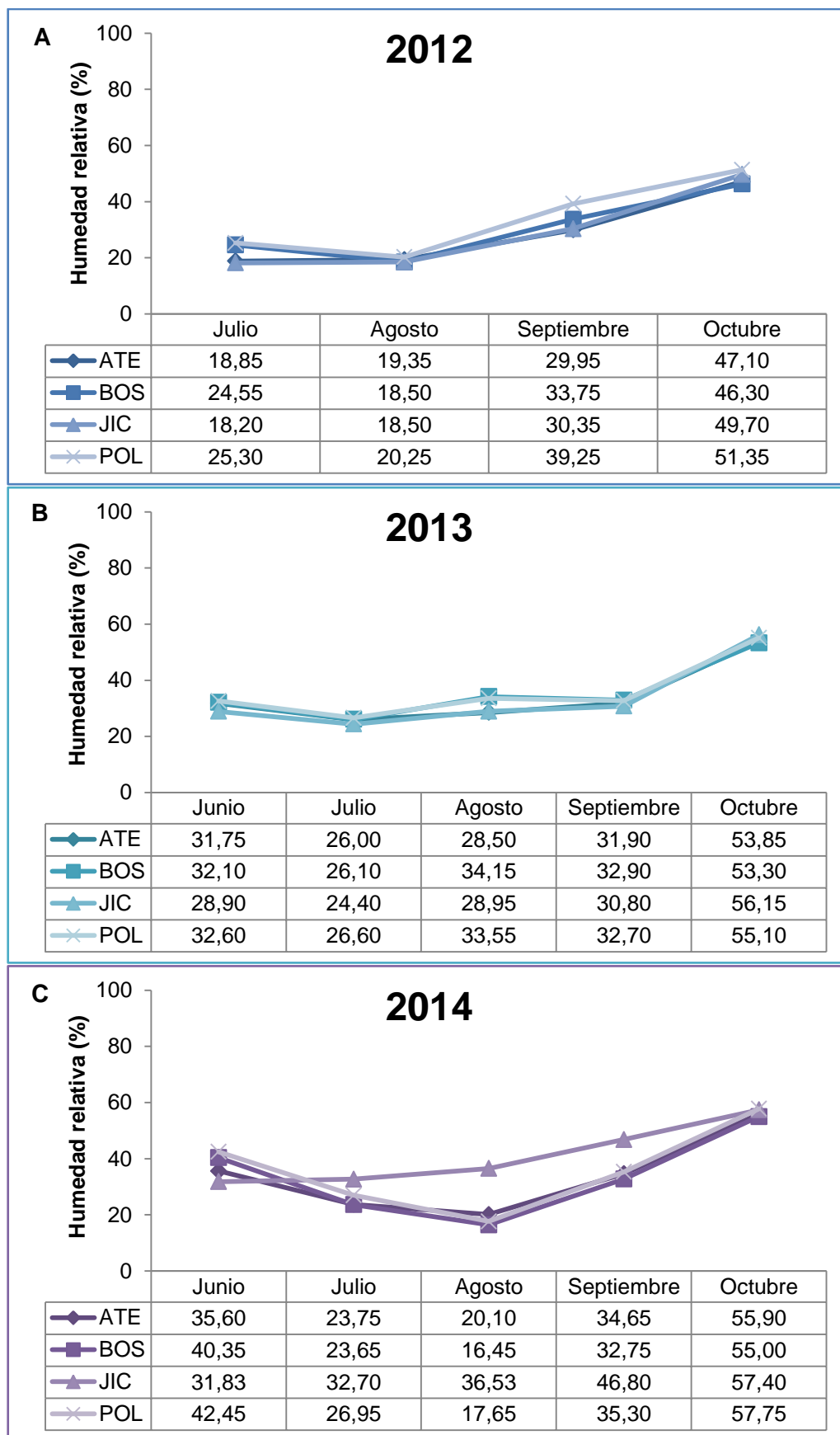


Figura 86. Valores medios de humedad relativa mínima registrada en las estaciones a lo largo de cada año de muestreo. **A) 2012, B) 2013, C) 2014.**

4.5. Fenología

4.5.1. Trampas adhesivas

El total de flebotomos capturados durante cada periodo de muestreo mediante trampas adhesivas fue de $n=8.825$, $n=8.630$ y $n=11.169$ en 2012, 2013 y 2014, respectivamente. Como se puede comprobar en la Tabla 33, el aumento del número de flebotomos en el último periodo de muestreo se debió a un incremento en el número de ejemplares tanto de *P. perniciosus* como de *S. minuta*.

Tabla 33. Número de flebotomos capturado cada mes durante los tres periodos de muestreo.

Año	Mes	Especie de flebotomo			Total
		<i>P. perniciosus</i>	<i>S. minuta</i>	<i>P. papatasi</i>	
2012	Junio	1.628	147	0	1.775
	Julio	1.203	1.011	0	2.214
	Agosto	1.640	1.121	0	2.761
	Septiembre	1.516	473	0	1.989
	Octubre	66	20	0	86
	TOTAL	6.053	2.772	0	8.825
2013	Junio	241	83	0	324
	Julio	917	705	1	1.623
	Agosto	866	1.404	0	2.270
	Septiembre	3.099	838	0	3.937
	Octubre	430	46	0	476
	TOTAL	5.553	3.076	1	8.630
2014	Junio	895	128	1	1.024
	Julio	1.027	864	0	1.891
	Agosto	1.481	1.581	0	3.062
	Septiembre	2.215	1.586	0	3.801
	Octubre	1.222	170	0	1.392
	TOTAL	6.840	4.329	1	11.170

En la Figura 87 se muestra la evolución de las capturas mediante trampas adhesivas a lo largo de los tres periodos de muestreo, más irregular en el caso de *P. perniciosus* con respecto a *S. minuta*. Concretamente, en las capturas de *P. perniciosus* (Figura 87A), durante 2012 se observó un descenso de junio a julio, para luego aumentar en agosto, mes en el que se registró el pico más alto de ejemplares. En 2013 y 2014, las capturas presentaron un aumento en julio para alcanzar el máximo en septiembre. En cuanto a *S. minuta* (Figura 87B), la dinámica de capturas siguió un mismo patrón durante los tres años, en los que el pico de capturas se encontró en agosto. La diferencia más sobresaliente fue la meseta observada en septiembre de 2014. En este mes se mantuvo el valor de capturas alcanzado en agosto, a diferencia de los otros dos periodos, en los

Resultados

que tuvo lugar un claro descenso en el número de *S. minuta*. El estudio de las diferencias entre las capturas mensuales a lo largo de los tres periodos indicó que no fueron significativas en el caso de *P. perniciosus* ($p=0,1008$), pero sí para *S. minuta* ($p=0,0043$).

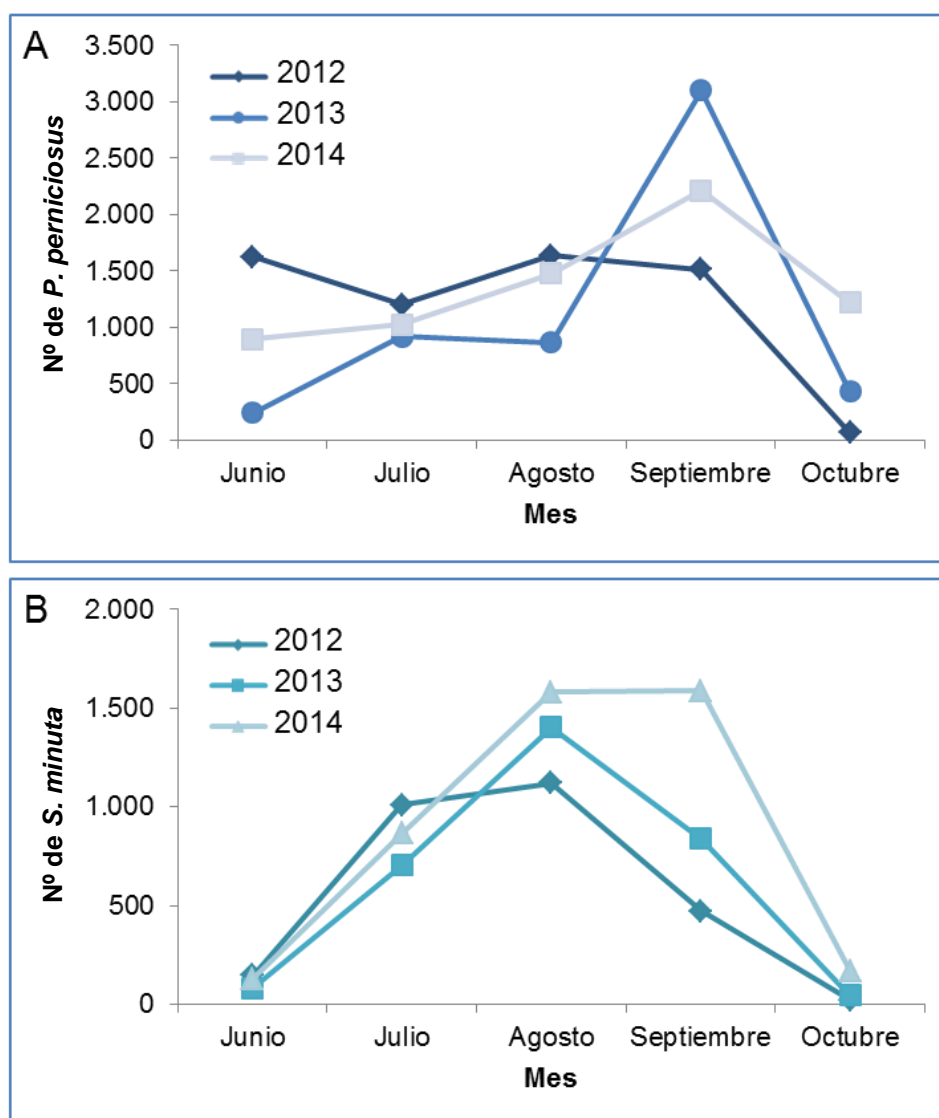


Figura 87. Evolución de las capturas mediante trampas adhesivas de *P. perniciosus* (A) y *S. minuta* (B) a lo largo de los meses de muestreo en cada año.

Como se puede apreciar en la Figura 88A, el número de machos de *P. perniciosus* capturado mediante trampas adhesivas fue muy superior al número de hembras. En general, se correlacionan las capturas de hembras y machos de esta especie, aunque se detectaron algunas excepciones en agosto de 2012 y 2013, y en julio de 2014, meses en los que el número de machos asciende y el de hembras disminuye. En cuanto a *S. minuta*, el número de hembras y machos capturado fue muy similar (Figura 88B), y la evolución de ambos a lo largo de los meses se mantuvo pareja, a excepción de agosto 2012, donde el número de machos aumentó, al contrario que el de hembras.

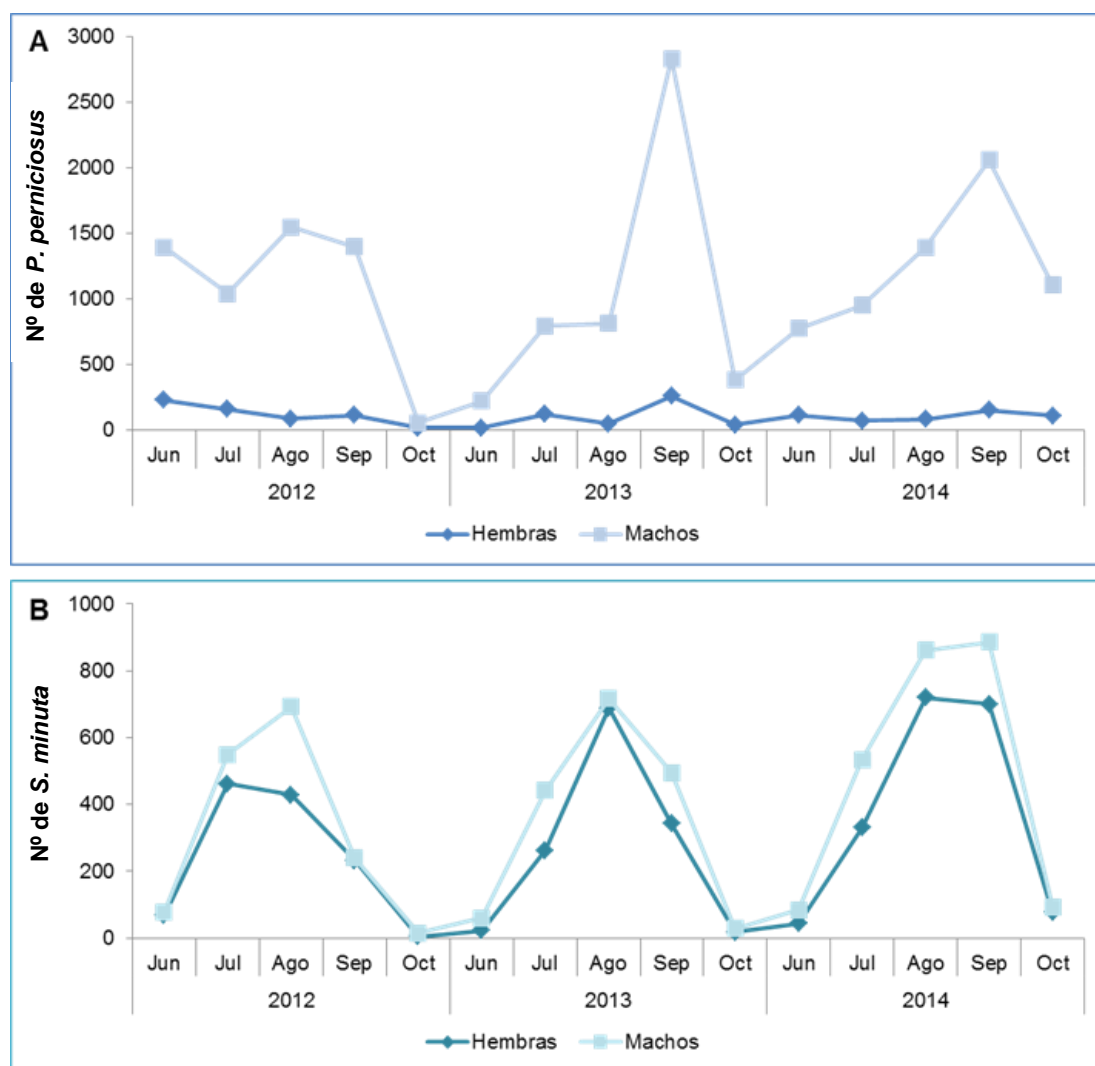


Figura 88. Evolución del número de hembras y de machos de *P. perniciosus* (A) y *S. minuta* (B) capturado con trampas adhesivas a lo largo de cada año del estudio.

4.5.1.1. Valores de densidad

Para el cálculo de la densidad de flebotomos se utilizó el valor de la superficie muestreada cada mes, que varió ligeramente según el número de trampas que no fueron recuperadas después de las dos noches de muestreo (Figura 89). El total de superficie anual muestreada fue de 31,84 m² en 2012 y 2014, y de 31,6 m² en 2013. En la Figura 90 se presenta la densidad mensual obtenida de *P. perniciosus* y *S. minuta* en cada periodo de muestreo. En el caso de *P. perniciosus* se detectaron diferencias significativas entre las densidades de junio, agosto y octubre (Tabla 34). Concretamente, las diferencias se encontraron entre junio de 2012 y 2013, al ser en el primer año muy superior; entre agosto de 2013 y de 2014, siendo superior en 2014; y entre octubre de 2012 y de 2014, siendo inferior la densidad en 2012 (Tabla 35). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los valores de densidad de *S. minuta* (Tabla 35). Debido al bajo número de ejemplares de *P. papatasi* capturados (n=2), la densidad resultante fue de 0,16 flebotomo/m², dato no representativo que no se ha incluido en las figuras.

Resultados

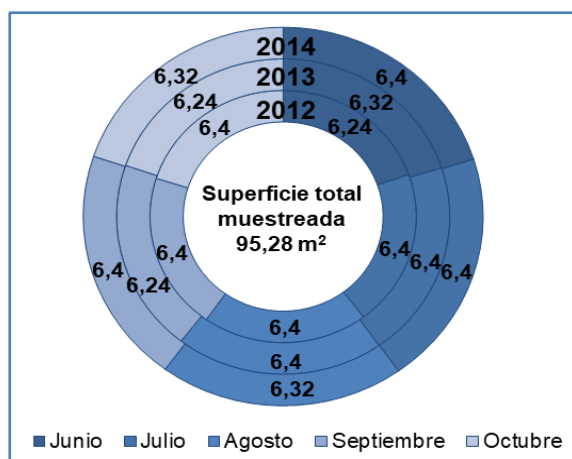


Figura 89. Superficie muestreada (m²) mensualmente a lo largo de los tres periodos de estudio.

Mes	Valor p	
	<i>P. perniciosus</i>	<i>S. minuta</i>
Junio	*0,0048	0,8906
Julio	0,6667	0,7061
Agosto	*0,0132	0,9945
Septiembre	0,1219	0,8151
Octubre	*0,0002	0,2397

Tabla 34. Análisis de las diferencias entre las densidades mensuales obtenidas a lo largo del muestreo (prueba de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$.

Tabla 35. Valores p obtenidos tras el análisis de las diferencias en las densidades mensuales de *P. perniciosus* (*P. per*) y *S. minuta* (*S. min*) de cada periodo de muestreo (prueba de comparación múltiple de Dunn). (*): $p < 0,05$.

	Valor p									
	Junio		Julio		Agosto		Septiembre		Octubre	
Año	<i>P. per</i>	<i>S. min</i>	<i>P. per</i>	<i>S. min</i>	<i>P. per</i>	<i>S. min</i>	<i>P. per</i>	<i>S. min</i>	<i>P. per</i>	<i>S. min</i>
2012 vs. 2013	*0,0182	>0,9999	0,9805	>0,9999	0,0725	>0,9999	0,1186	>0,9999	0,3502	>0,9999
2012 vs. 2014	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	*0,0051	0,2570
2013 vs. 2014	0,1497	>0,9999	>0,9999	>0,9999	*0,0428	>0,9999	0,7181	>0,9999	0,3502	>0,9999

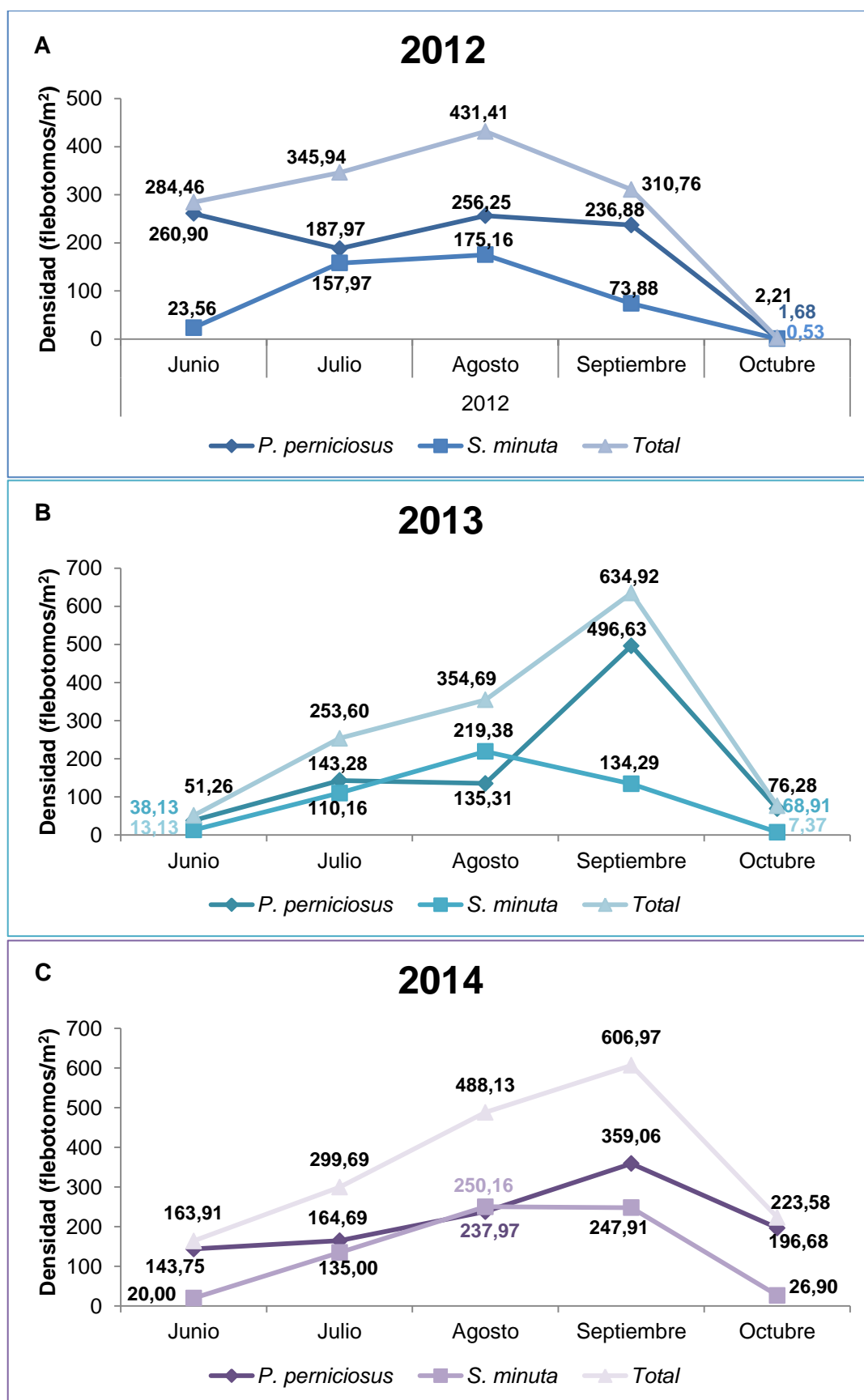


Figura 90. Densidad total (flebotomos/m²), densidad de *P. perniciosus* y densidad de *S. minuta*, calculadas para cada mes durante los tres años de muestreo. **A) 2012, B) 2013, C) 2014.**

4.5.2. Trampas de luz

El total de flebotomos capturados durante cada periodo mediante trampas de luz tipo CDC fue de $n=8.492$, $n=3.777$ y $n=4.233$ en 2012, 2013 y 2014, respectivamente. Como se puede observar en la Tabla 36, la diferencia en el número de flebotomos registrado en 2012 es debida a que se capturó un mayor número de ejemplares de *P. perniciosus*, destacando los meses de julio y agosto. Así mismo, el número de ejemplares de *P. perniciosus* fue mucho mayor al de *S. minuta* en los tres años del estudio

Tabla 36. Número de flebotomos capturado mensualmente mediante trampas de luz a lo largo de los tres periodos de muestreo.

Año	Mes	Especie de flebotomo			Total
		<i>P. perniciosus</i>	<i>S. minuta</i>	<i>P. sergenti</i>	
2012	Junio	1.661	19	0	1.680
	Julio	2.127	144	1	2.271
	Agosto	3.367	207	1	3.574
	Septiembre	875	76	0	951
	Octubre	14	0	0	14
	TOTAL	8.044	446	2	8.492
2013	Junio	126	24	0	150
	Julio	665	49	0	714
	Agosto	730	147	0	877
	Septiembre	1.830	84	0	1.914
	Octubre	118	4	0	122
	TOTAL	3.469	308	0	3.777
2014	Junio	725	8	0	733
	Julio	729	67	0	796
	Agosto	923	58	0	981
	Septiembre	1.434	53	0	1.487
	Octubre	226	10	0	236
	TOTAL	4.037	196	0	4.233

En la Figura 91A se observa que las capturas de *P. perniciosus* realizadas en 2012 mostraron su máximo en agosto, mientras que en 2013 y 2014 se produjo en septiembre. Estas diferencias en el número de *P. perniciosus* durante cada mes, entre los tres periodos, no fueron significativas ($p=0,0766$). En cuanto a *S. minuta*, el número de ejemplares no fue muy elevado, lo que ha dificultado el establecimiento de un patrón claro. Aun así, tal como se muestra en la Figura 91B, en 2012 y 2013 el mes con mayor número de flebotomos de esta especie fue agosto, mientras que en 2014 fue julio, aunque la diferencia con los dos meses posteriores fue escasa. Además, se observaron diferencias significativas en las capturas mensuales entre los tres periodos ($p=0,0025$); concretamente, en agosto y octubre ($p=0,0467$).

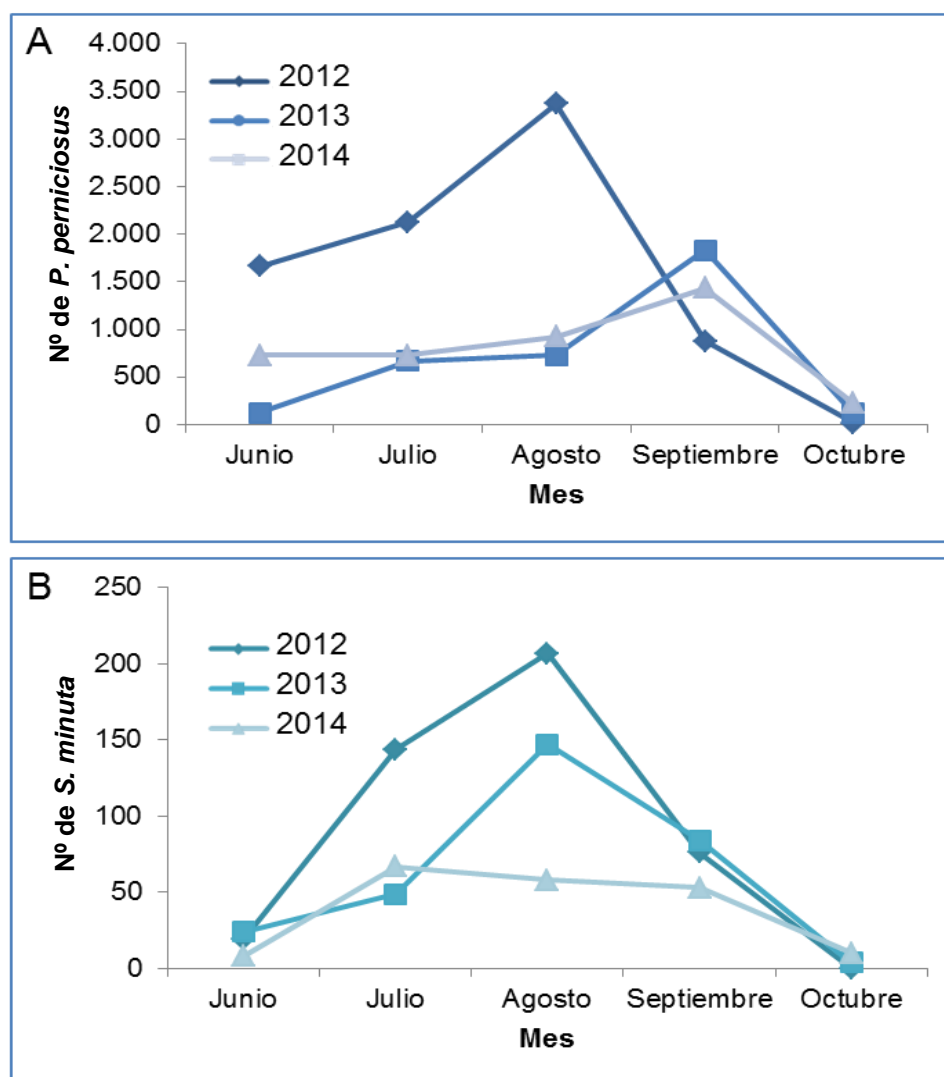


Figura 91. Evolución de las capturas mensuales de *P. perniciosus* (A) y *S. minuta* (B) obtenidas mediante trampas de luz cada año de muestreo.

En las Figuras 92A y 92B se representa la evolución de las capturas de hembras y machos de *P. perniciosus* y *S. minuta* a lo largo de cada año, respectivamente. En el caso de la primera especie, el mayor número de hembras en el año 2012 se observó en el mes de julio, mientras que en los machos se registró en el mes de agosto. En los otros dos años, el número de hembras y machos evoluciona de manera pareja apareciendo el pico de capturas en septiembre, tal como se comentó anteriormente. En relación a las capturas de *S. minuta*, en los años 2012 y 2014 se encontró un mayor número de machos que de hembras, mientras que en el año 2013, las capturas fueron muy similares. Así mismo, en 2012 y 2013 agosto fue el mes con mayor número de flebotomos, tanto de hembras como de machos. Sin embargo, en 2014 el número de hembras fue muy similar en julio y agosto, sin mostrar un pico claramente diferenciado, mientras que en el caso de los machos se observó un patrón bimodal, con valores máximos en julio y septiembre.

Resultados

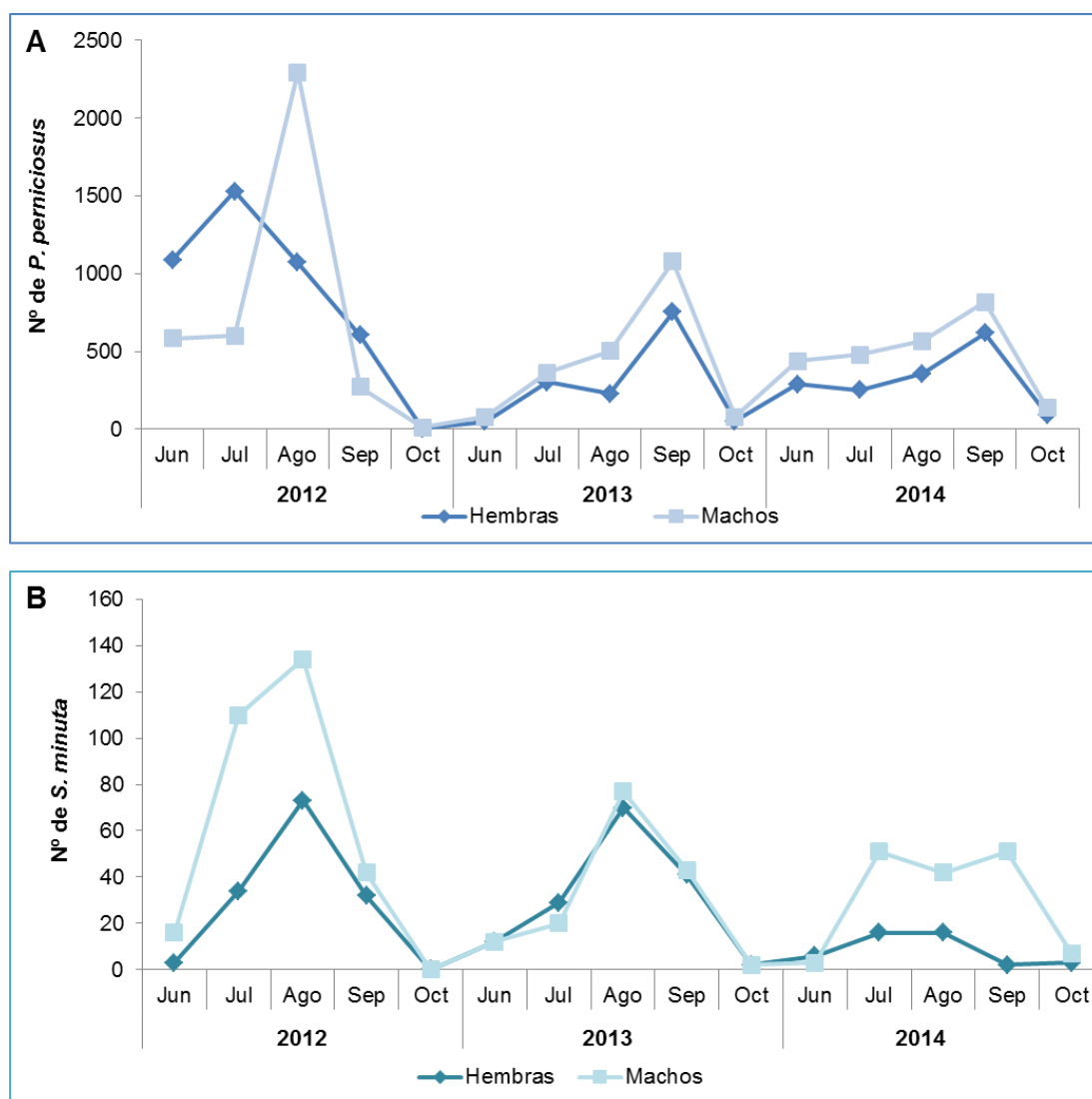


Figura 92. Evolución del número de hembras y machos de *P. perniciosus* (A) y *S. minuta* (B) capturado mediante trampas de luz a lo largo de cada año del estudio.

4.5.3. Relación entre los flebotomos capturados y los parámetros climáticos

A lo largo de cada periodo de muestreo los valores de temperatura y humedad relativa sufrieron variaciones que se relacionan con las capturas de flebotomos, tal como se refleja en las Figuras 93 y 94. Las relaciones entre el número de flebotomos capturado y estos dos factores climáticos se estudiaron mediante el test de correlación de Spearman, tanto de manera global como por tipo de trampa empleado.

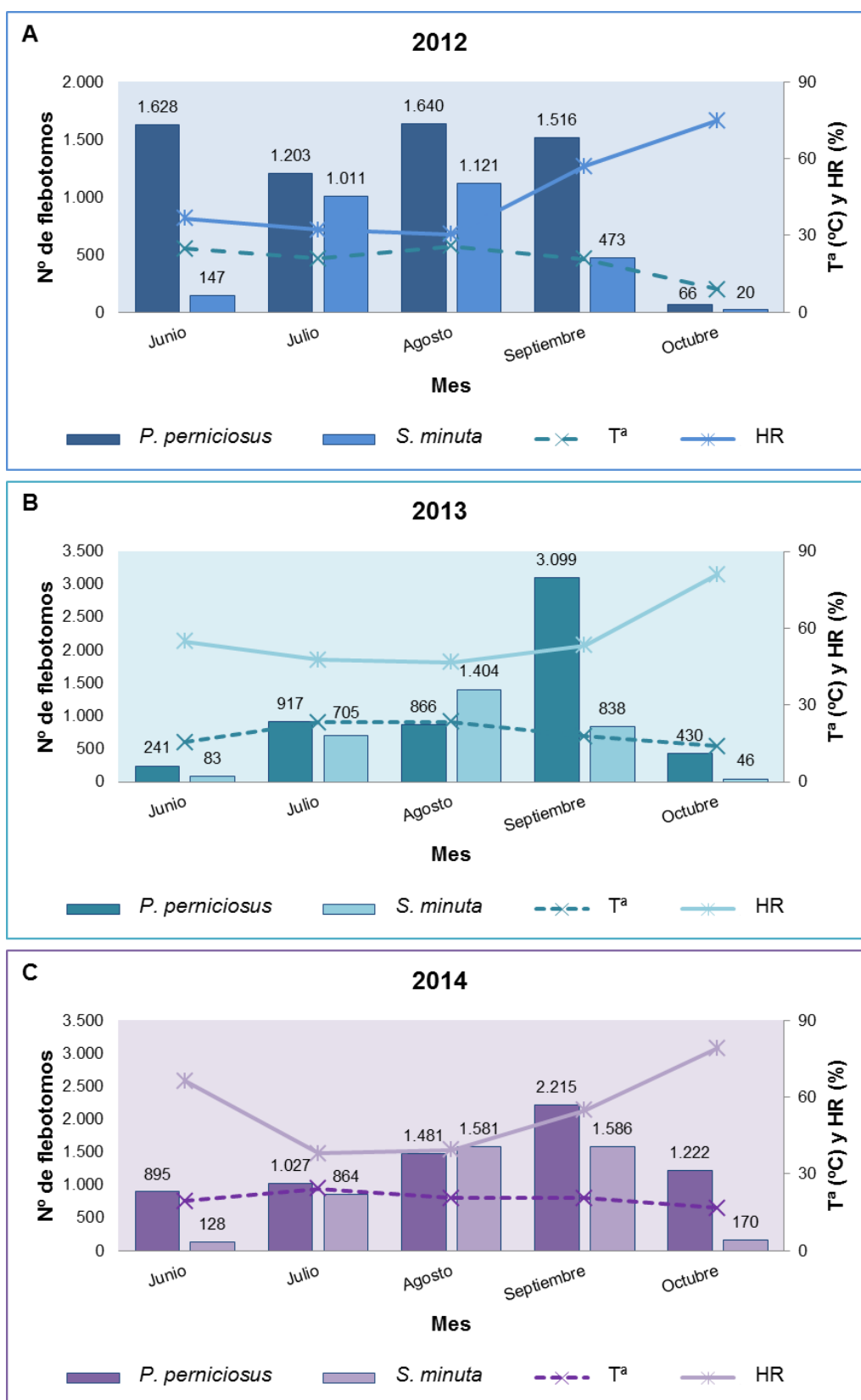


Figura 93. Número de ejemplares de *P. perniciosus* y *S. minuta* capturado mensualmente mediante trampas adhesivas durante cada periodo de muestreo, en relación con la temperatura y humedad registrada. **A) 2012, B) 2013, C) 2014.** T^a (°C), temperatura en grados Celsius; HR, humedad relativa.

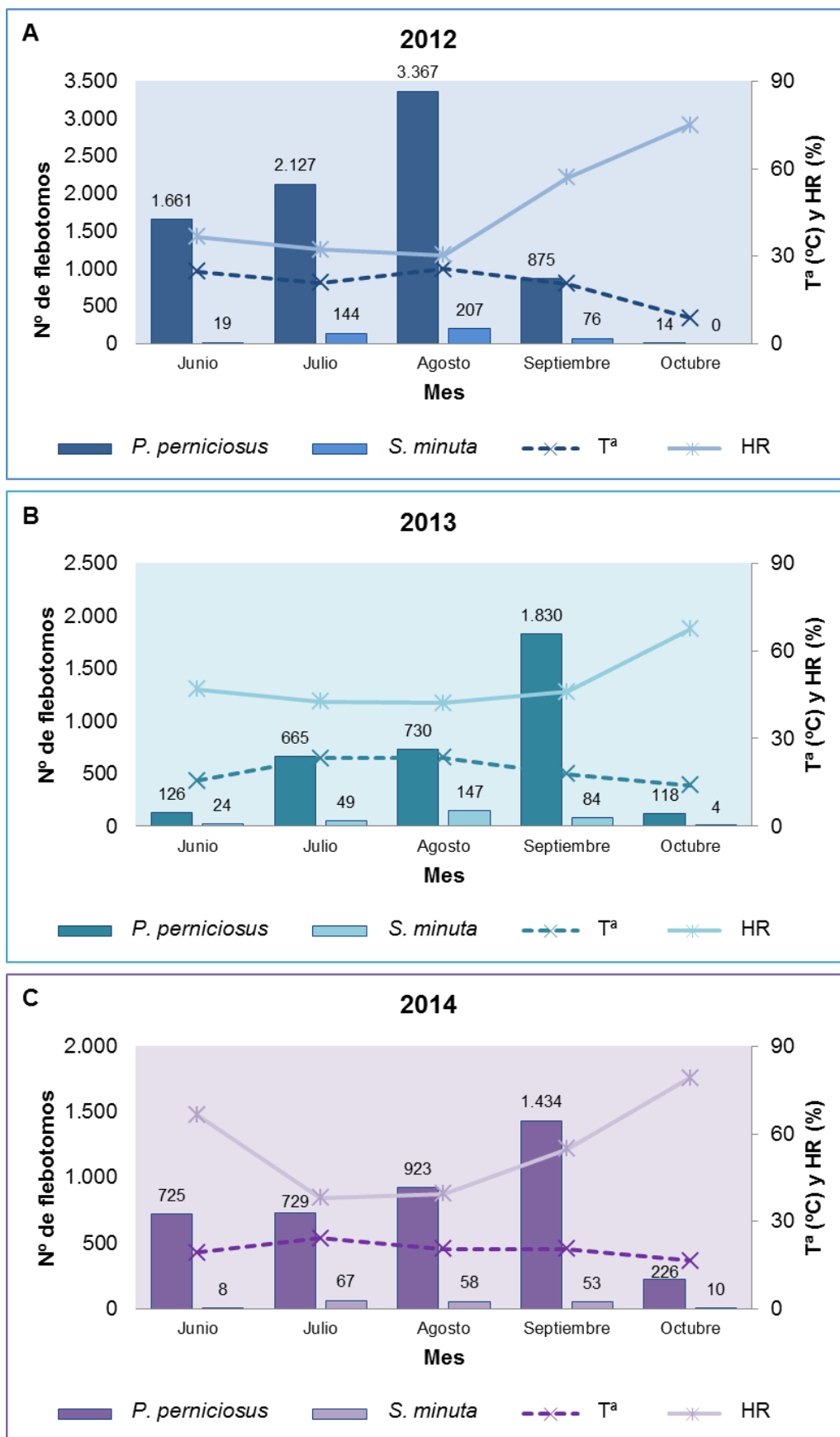


Figura 94. Número de ejemplares de *P. perniciosus* y *S. minuta* capturado mensualmente mediante trampas de luz en cada periodo de muestreo, en relación con la temperatura y humedad relativa registradas. **A) 2012, B) 2013, C) 2014.** T^a (°C), temperatura en grados Celsius; HR, humedad relativa.

4.5.3.1. Relación entre flebotomos capturados y los valores registrados de temperatura

4.5.3.1.1. Capturas totales

El estudio de correlación del número de ejemplares de *P. perniciosus* y *S. minuta* capturados con los valores de temperatura registrados dio como resultado una relación positiva. La correlación fue mayor para *S. minuta* (***P. perniciosus***: Tª media, $r=0,4$; Tª máxima, $r=0,7$; Tª mínima, $r=0,6$. ***S. minuta***: Tª media, $r=0,7$; Tª máxima, $r=0,9$; Tª mínima, $r=0,7$). Sin embargo, esta correlación no fue significativa en ningún caso ($p>0,05$).

El análisis de cada periodo de muestreo puso de manifiesto que esta relación positiva entre capturas y temperatura fue mayor en 2012, aunque sin llegar a ser significativa ($p>0,05$ en todos los casos) (Tabla 37).

Año	Especie de flebotomo	Coeficiente de correlación (r)		
		Tª media	Tª máxima	Tª mínima
2012	<i>P. perniciosus</i>	0,9	1	0,8
	<i>S. minuta</i>	0,7	1	0,8
2013	<i>P. perniciosus</i>	0,6	0,5	0,7
	<i>S. minuta</i>	0,9	0,7	0,8
2014	<i>P. perniciosus</i>	0,6	0,6	0,5
	<i>S. minuta</i>	0,5643	0,5643	0,2052

Tabla 37. Relación del número total de flebotomos capturados frente a los valores de temperatura media, máxima y mínima registrados en cada periodo de muestreo (test de correlación de Spearman).

4.5.3.1.2. Flebotomos capturados mediante trampas adhesivas

El estudio de correlación entre el número de flebotomos capturados mediante trampas adhesivas en cada periodo de muestreo y los valores de temperatura también muestra mayoritariamente una relación positiva, tanto para *P. perniciosus* como para *S. minuta*. La excepción se produjo con *P. perniciosus* en 2014, donde se observó una leve relación negativa con la temperatura mínima. Sin embargo, no se encontraron relaciones significativas en ninguno de los tres periodos de muestreo ($p>0,05$ en todos los casos). Así mismo, tal como se señala en la Tabla 38, *S. minuta* presentó mayor correlación positiva con los valores de temperatura que *P. perniciosus* en todos los periodos de muestreo.

Año	Especie de flebotomo	Coeficiente de correlación (r)		
		Tª media	Tª máxima	Tª mínima
2012	<i>P. perniciosus</i>	0,8	0,8	0,4
	<i>S. minuta</i>	1	1	0,8
2013	<i>P. perniciosus</i>	0,5	0,6	0,6
	<i>S. minuta</i>	0,9	0,7	0,8
2014	<i>P. perniciosus</i>	0,1	0,1	-0,1
	<i>S. minuta</i>	0,5	0,5	0,3

Tabla 38. Relación de los flebotomos capturados mediante trampas adhesivas con las temperaturas medias, máximas y mínimas registradas en cada periodo de muestreo (test de correlación de Spearman).

Los resultados de los análisis de correlación muestran que la temperatura se relacionó de manera diferente con el número de hembras y de machos capturados. En el total de flebotomos capturados mediante trampas adhesivas durante los tres años de muestreo se observó que la temperatura media, máxima y mínima se relacionó positivamente con los machos de *P. perniciosus* y con hembras y machos de *S. minuta*. Sin embargo no hubo relación, o fue baja, con las hembras de *P. perniciosus*. Esta misma relación se detectó en cada año por separado, a excepción de 2014, donde la relación de *P. perniciosus*, tanto hembras como machos, fue negativa (Tabla 39). En ningún caso la relación observada fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$ en todos los casos).

Tabla 39. Relación de hembras y machos de *P. perniciosus* y *S. minuta* capturados mediante trampas adhesivas con los valores de temperatura media, máxima y mínima registrados a lo largo del estudio entomológico (test de correlación de Spearman).

Año	Especie de flebotomo	Coeficiente de correlación (r)					
		Tª media		Tª máxima		Tª mínima	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂
Global	<i>P. perniciosus</i>	0	0,4	0,1	0,7	0,2	0,6
	<i>S. minuta</i>	0,7	0,7	0,9	0,9	0,7	0,7
2012	<i>P. perniciosus</i>	0,4	0,8	0,4	0,8	0,8	0,4
	<i>S. minuta</i>	0,8	1	0,8	1	1	0,8
2013	<i>P. perniciosus</i>	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6	0,7
	<i>S. minuta</i>	0,9	0,9	0,7	0,7	0,8	0,8
2014	<i>P. perniciosus</i>	-0,6	-0,2	-0,6	-0,2	-0,1	-0,2
	<i>S. minuta</i>	0,6	0,5	0,6	0,5	0,1	0,3

4.5.3.1.3. Flebotomos capturados mediante trampas de luz

En el caso de los flebotomos capturados con trampas de luz, la relación fue igualmente positiva, pero mayor que con las trampas adhesivas (*P. perniciosus*: Tª media, $r=0,7$; Tª máxima, $r=0,9$; Tª mínima, $r=0,7$. *S. minuta*: Tª media, $r=0,9$; Tª máxima, $r=1^*$; Tª mínima, $r=0,9$). Solamente en el caso de *S. minuta*, se observó una correlación positiva significativa con la temperatura máxima ($p=0,0167$).

La relación entre las capturas anuales y las temperaturas registradas fue igualmente positiva durante todos los años. Esta relación fue mayor en 2012 para los tres valores de temperatura. En 2013 y 2014 se observó que la correlación positiva fue mayor en *S. minuta* (Tabla 40). Los estudios mostraron que en ningún caso esta relación fue significativa ($p > 0,05$ en todos los casos).

Año	Especie de flebotomo	Coeficiente de correlación (r)		
		Tª media	Tª máxima	Tª mínima
2012	<i>P. perniciosus</i>	1	1	0,8
	<i>S. minuta</i>	1	1	0,8
2013	<i>P. perniciosus</i>	0,7	0,6	0,6
	<i>S. minuta</i>	0,9	0,7	0,8
2014	<i>P. perniciosus</i>	0,6	0,6	0,5
	<i>S. minuta</i>	0,9	0,9	0,5

Tabla 40. Relación de los flebotomos capturados mensualmente mediante trampas de luz y las temperaturas medias, máximas y mínimas registradas en cada periodo de muestreo (test de correlación de Spearman).

Respecto a la relación con la temperatura de las hembras y machos capturados mediante trampas de luz, se observó una relación positiva tanto en las capturas globales como en su análisis por año de muestreo. Como se muestra en la Tabla 41, la relación fue mayor en el caso de *S. minuta*, tanto en las hembras como en los machos, entre los que no hubo apenas diferencias. Además, se observó que la relación fue significativa entre el total de hembras y machos de *S. minuta* con la temperatura máxima ($p = 0,0167$, en ambos casos). En el caso de los machos de *P. perniciosus* los análisis mostraron que la relación con la temperatura media y máxima fue generalmente mayor que frente a las hembras.

Tabla 41. Relación de hembras y machos de *P. perniciosus* y *S. minuta* capturados mediante trampas de luz con los valores de temperatura media, máxima y mínima registrados a lo largo del estudio (test de correlación de Spearman).

Año	Especie de flebotomo	Coeficiente de correlación (r)					
		Tª media		Tª máxima		Tª mínima	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂
Global	<i>P. perniciosus</i>	0,5	0,7	0,7	0,9	0,9	0,7
	<i>S. minuta</i>	0,9	0,9	*1	*1	0,9	0,9
2012	<i>P. perniciosus</i>	0,8	1	0,8	1	1	0,8
	<i>S. minuta</i>	1	0,8	1	0,8	0,8	1
2013	<i>P. perniciosus</i>	0,5	0,6669	0,6	0,5643	0,6	0,6669
	<i>S. minuta</i>	0,9	0,9	0,7	0,7	0,8	0,8
2014	<i>P. perniciosus</i>	0,1	0,6	0,1	0,6	0,4	0,5
	<i>S. minuta</i>	0,6669	0,7182	0,6669	0,7182	0,1539	0,6669

Resultados

En líneas generales, el número de flebotomos capturados se relacionó positivamente con los valores de temperatura media, máxima y mínima, tanto a nivel en global como durante cada periodo. Además, se encontró que la relación fue mayor con las capturas realizadas mediante trampas de luz y con *S. minuta*, en relación a las trampas adhesivas a *P. perniciosus*, respectivamente.

4.5.3.2. Relación entre flebotomos capturados y los valores de humedad relativa

4.5.3.2.1. Capturas totales

El estudio de correlación entre el número de *P. perniciosus* y *S. minuta* y los valores de humedad relativa registrados mostró una relación negativa, pero no significativa ($p > 0,05$ en todos los casos). Así mismo, se observó que la correlación negativa fue mayor en *S. minuta* para los tres valores de humedad relativa (***P. perniciosus***: HR media, $r = -0,4$; HR máxima, $r = -0,6$; HR mínima, $r = -0,7$. ***S. minuta***: HR media, $r = -0,7$, HR máxima, $r = -0,7$; HR mínima, $r = -0,9$).

Al estudiar cada periodo de muestreo por separado, se observó que en el año 2012 se registró una mayor correlación negativa entre el número de flebotomos y los valores de humedad relativa, siendo significativos en el caso de *P. perniciosus* frente a la humedad relativa media ($p = 0,0167$) (Tabla 42).

Año	Especie de flebotomo	Coeficiente de correlación (r)		
		HR media	HR máxima	HR mínima
2012	<i>P. perniciosus</i>	*-1	-0,8	-1
	<i>S. minuta</i>	-0,9	-0,8	-1
2013	<i>P. perniciosus</i>	-0,6	-0,6	-0,1
	<i>S. minuta</i>	-0,9	-0,9	-0,5
2014	<i>P. perniciosus</i>	-0,6	-0,6	-0,7
	<i>S. minuta</i>	-0,5643	-0,5643	-0,7182

Tabla 42. Relación entre los flebotomos capturados con respecto a los valores registrados de humedad relativa (HR) media, máxima y mínima durante cada año de muestreo (test de correlación de Spearman). (*): $p < 0,05$.

4.5.3.2.2. Flebotomos capturados mediante trampas adhesivas

El estudio de correlación entre las capturas realizadas con trampas adhesivas de cada periodo y los valores de humedad relativa mostró nuevamente una correlación negativa. Esta relación fue superior en el año 2012, aunque no fue significativa en ningún caso ($p > 0,05$ en todos los casos). Así mismo, esta relación negativa fue mayor en *S. minuta* en relación con *P. perniciosus* (Tabla 43).

Año	Especie de flebotomo	Coeficiente de correlación (r)		
		HR media	HR máxima	HR mínima
2012	<i>P. perniciosus</i>	-0,8	-0,4	-0,8
	<i>S. minuta</i>	-1	-0,8	-1
2013	<i>P. perniciosus</i>	-0,5	-0,5	-0,2
	<i>S. minuta</i>	-0,9	-0,9	-0,5
2014	<i>P. perniciosus</i>	-0,1	-0,1	-0,3
	<i>S. minuta</i>	-0,5	-0,5	-0,6

Tabla 43. Relación entre los flebotomos capturados mediante trampas adhesivas y los valores de humedad relativa (HR) media, máxima y mínima registrados en cada periodo (test de correlación de Spearman).

Por otro lado, se observaron diferencias en la relación de los valores de humedad relativa con respecto a las hembras y machos capturados. En el caso de *P. perniciosus*, la relación negativa fue mayor en los machos, excepto en 2012. Entre hembras y machos de *S. minuta* no se observan apenas diferencias. Destaca la relación positiva de *P. perniciosus* con los valores de humedad relativa en 2014. En ningún caso se encontraron relaciones significativas ($p>0,05$) (Tabla 44).

Tabla 44. Relación entre hembras y machos de *P. perniciosus* y *S. minuta* capturados con trampas adhesivas y los valores de humedad relativa (HR) media, máxima y mínima registrados a lo largo del estudio (test de correlación de Spearman).

Año	Especie de flebotomo	Coeficiente de correlación (r)					
		HR media		HR máxima		HR mínima	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂
Global	<i>P. perniciosus</i>	0	-0,4	-0,2	-0,6	-0,1	-0,7
	<i>S. minuta</i>	-0,7	-0,7	-0,7	-0,7	-0,9	-0,9
2012	<i>P. perniciosus</i>	-0,4	-0,8	-0,8	-0,4	-0,4	-0,8
	<i>S. minuta</i>	-0,8	-1	-1	-0,8	-0,8	-1
2013	<i>P. perniciosus</i>	-0,5	-0,6	-0,5	-0,6	-0,2	-0,1
	<i>S. minuta</i>	-0,9	-0,9	-0,9	-0,9	-0,5	-0,5
2014	<i>P. perniciosus</i>	0,6	0,2	0,6	0,2	0,5	0,1
	<i>S. minuta</i>	-0,6	-0,5	-0,6	-0,5	-0,8	-0,6

4.5.3.2.3. Flebotomos capturados mediante trampas de luz

En el caso de los flebotomos capturados con trampas de luz también se observó una relación negativa con los tres valores de humedad relativa estudiados (*P. perniciosus*: HR media, $r=-0,7$; HR máxima, $R=-0,7$; HR mínima, $r=-0,9$. *S. minuta*: HR media, $r=-0,9$, HR máxima, $r=-0,9$; HR mínima, $r=-1^*$). Esta relación fue mayor en el caso de la humedad relativa mínima, siendo significativa para las capturas de *S. minuta* ($p=0,0167$).

Resultados

La relación entre las capturas realizadas cada año con trampas de luz y la humedad relativa fue negativa en todos ellos, aunque con valores no significativos ($p > 0,05$ en todos los casos). En 2012 se encontró que la relación fue mayor que en los otros dos años, pero sin mostrarse diferencias para *P. perniciosus* y *S. minuta*. En los otros dos periodos se encontró una disminución en la correlación, aunque menor para *S. minuta* (Tabla 45).

Año	Especie de flebotomo	Coeficiente de correlación (r)		
		HR media	HR máxima	HR mínima
2012	<i>P. perniciosus</i>	-1	-1	-1,0
	<i>S. minuta</i>	-1	-1	-1,0
2013	<i>P. perniciosus</i>	-0,7	-0,7	-0,3
	<i>S. minuta</i>	-0,9	-0,9	-0,5
2014	<i>P. perniciosus</i>	-0,6	-0,6	-0,7
	<i>S. minuta</i>	-0,9	-0,9	-0,8

Tabla 45. Relación entre los flebotomos capturados mediante trampas de luz y los valores de humedad relativa (HR) media, máxima y mínima registrados en cada periodo de muestreo (test de correlación de Spearman).

Al estudiar hembras y machos por separado, la relación negativa fue similar para ambos, tanto en *P. perniciosus* como en *S. minuta*. En el caso de esta última especie, se observó que la relación fue significativa entre las capturas globales y los valores de temperatura mínima ($p = 0,0167$, para hembras y machos) (Tabla 46).

Tabla 46. Relación entre el número de hembras y machos de *P. perniciosus* y *S. minuta* capturados mediante trampas de luz y los valores de humedad relativa (HR) media, máxima y mínima registrados a lo largo del estudio (test de correlación de Spearman). (*): $p < 0,05$.

Año	Especie de flebotomo	Coeficiente de correlación (r)					
		HR media		HR máxima		HR mínima	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂
Global	<i>P. perniciosus</i>	-0,5	-0,7	-0,9	-0,7	-0,7	-0,9
	<i>S. minuta</i>	-0,9	-0,9	-0,9	-0,9	*-1	*-1
2012	<i>P. perniciosus</i>	-0,8	-1	-1	-0,8	-0,8	-1
	<i>S. minuta</i>	-1	-0,8	-0,8	-1	-1	-0,8
2013	<i>P. perniciosus</i>	-0,5	-0,6669	-0,5	-0,6669	-0,2	-0,2052
	<i>S. minuta</i>	-0,9	-0,9	-0,9	-0,9	-0,5	-0,5
2014	<i>P. perniciosus</i>	-0,1	-0,6	-0,1	-0,6	-0,2	-0,7
	<i>S. minuta</i>	-0,6669	-0,7182	-0,6669	-0,7182	-0,6669	-0,5643

En general, se observó una correlación negativa entre las capturas de flebotomos y los valores de humedad media, máxima y mínima. En 2012 esta relación fue superior a los otros dos periodos y, en todos ellos fue *S. minuta* la especie que presentó una mayor correlación negativa con la humedad relativa.

4.6. Aislamiento y caracterización de aislados de *Leishmania*

4.6.1. Tasas de infección

El número total de hembras de flebotomo disecadas durante los tres años de muestreo fue de 3.203, detectándose promastigotes en los tubos digestivos de 117 ejemplares, lo que supuso una tasa de infección media del 3,65%. Desglosando por año de muestreo, en 2012 se encontraron promastigotes en 19 hembras de un total de 735 disecadas (2,6%), siendo agosto y septiembre los meses con las tasas de infección más altas. Destacando la tasa hallada en la estación BOS en el mes de septiembre (12,60%) (Figura 95A). En 2013 se disecaron 864 hembras, siendo positivas 57 (6,6%). Este año los meses con mayores tasas de infección fueron agosto y octubre, en los que los valores sobrepasaron el 10% en todas las estaciones, a excepción de ATE. Destacaron los valores encontrados en la estación POL, en torno el 30% de ejemplares infectados (Figura 95B). Finalmente, en 2014 la tasa de infección volvió a disminuir al detectarse un 2,6% de hembras infectadas (41 de 1.604 disecadas). Los valores más altos de este año se encontraron entre agosto, septiembre y octubre, dependiendo de la estación de muestreo, como se puede comprobar en la Figura 95C. El análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre las tasas de infección de los tres periodos de muestreo ($p=0,4627$).

Como se muestra en la Figuras 95A, 95B y 95C, los datos de las tasas de infección variaron entre las cuatro estaciones. Durante 2012 y 2013 las estaciones con mayores tasas de infección fueron BOS y POL. Sin embargo, en 2014 las tasas de infección encontradas en POL disminuyeron, mientras que en BOS se mantuvieron elevadas y aumentaron en la estación JIC. Las diferencias en las tasas de infección entre estaciones sólo fueron significativas en 2014 (2012, $p=0,5627$; 2013, $p=0,4404$ y 2014, $p=0,0184$). Por otro lado, las tasas de infección de cada estación a lo largo de los tres periodos de muestreo sólo mostraron diferencias significativas en la estación JIC ($p=0,0298$).

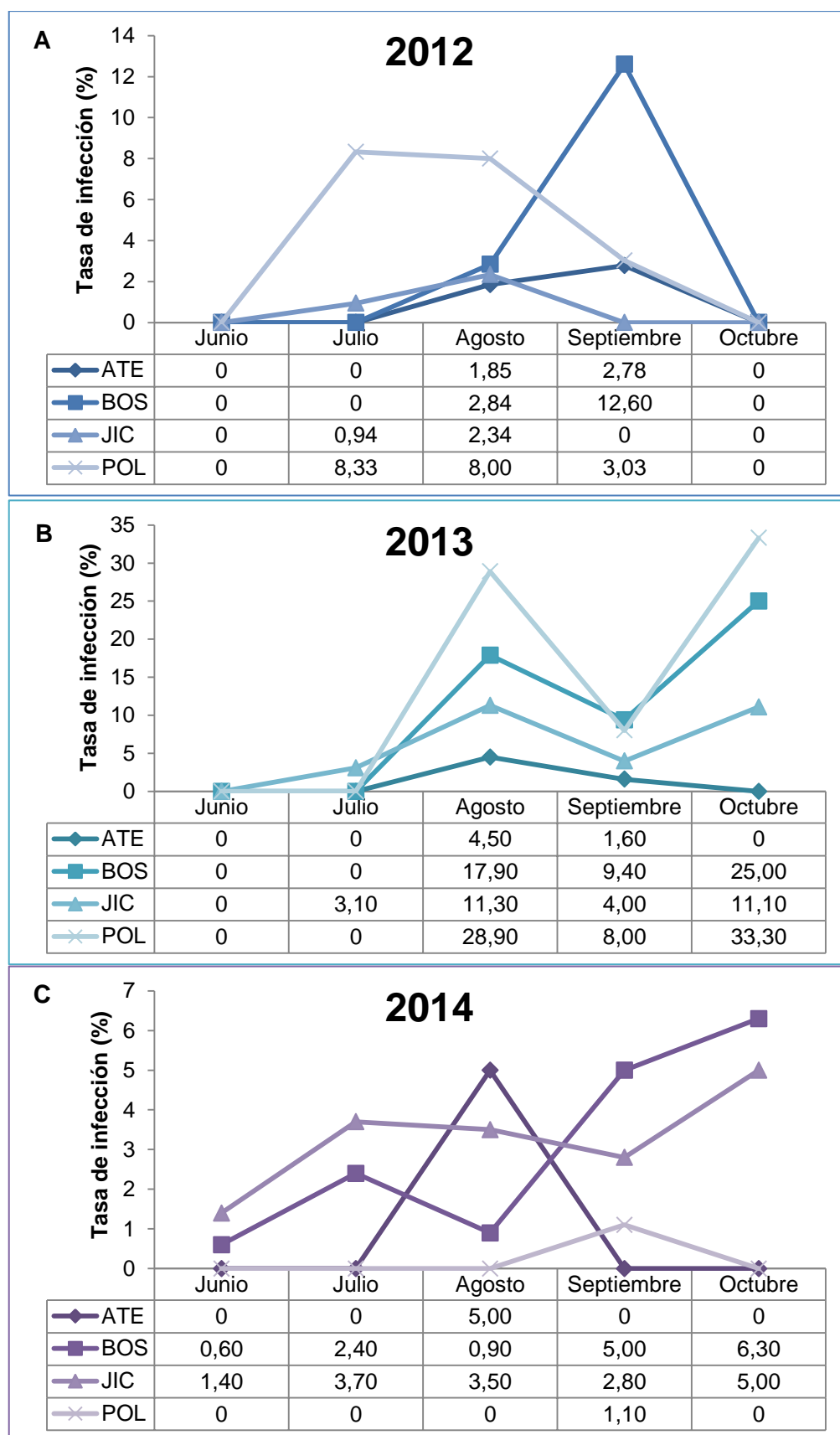


Figura 95. Evolución de las tasas de infección en *P. perniciosus* para cada estación a lo largo de los tres periodos de muestreo. **A) 2012, B) 2013, C) 2014.**

4.6.1.1. Relación de la tasa de infección con los valores de densidad, el número de *P. perniciosus* capturado mediante trampas de luz y los parámetros climáticos

El análisis de la relación entre la densidad de *P. perniciosus* en los tres años de muestreo fue ligeramente positiva en 2012 y 2013, incrementándose en 2014 (2012, $r=0,1026$; 2013, $r=0,2$; 2014, $r=0,7$). Esta relación no fue significativa en ningún caso ($p>0,05$).

Por otro lado, también se encontró una leve relación positiva entre el número de *P. perniciosus* capturado con trampas de luz y las tasas de infección en 2012 ($r=0,3078$) y 2013 ($r=0,2$), sin ser significativas ($p>0,05$). En 2014 no se halló relación al ser $r=0$.

Al estudiar la posible relación entre la tasa de infección y el valor de la temperatura media registrada se observó una leve relación positiva en 2012 ($r=0,4$) y 2013 ($r=0,3$), mientras que en 2014 fue negativa ($r=-0,4$). Sin embargo, ninguna de estas relaciones fue significativa ($p>0,05$).

En el caso de la humedad relativa media, se observó que las tasas de infección se relacionaron negativamente con este parámetro en 2012 ($r=-0,4$) y 2013 ($r=-0,3$), y positivamente en 2014 ($r=0,4$), aunque en ningún año dichas relaciones fueron significativas ($p>0,05$).

4.6.2. Caracterización de los aislados mediante amplificación de las regiones ITS1 e ITS2

De las 117 hembras de *P. perniciosus* en las que se visualizaron promastigotes durante las disecciones se consiguieron aislar, cultivar y caracterizar de manera satisfactoria 67 (57,26%). En 2012 y 2013 se caracterizaron más de un 70% de los aislados (73,68% y 77,19%, respectivamente); sin embargo, en 2014, el porcentaje disminuyó de manera acusada hasta un 31,70% debido a que un gran número de aislados se contaminó con hongos y/o bacterias (28 de los 41 aislados), lo que impidió el crecimiento de los promastigotes. Tras el análisis y alineamiento de la secuencias, se estudiaron 8 regiones microsatélites polimórficas presentes en las regiones ITS1 e ITS2, cuyas variaciones permiten diferenciar las especies de *L. infantum*. Los resultados concluyeron que todos los aislados correspondían al genotipo ITS-Lombardi (Figura 96). En el Anexo 1 se recogen los alineamientos de las secuencias completas correspondientes a los aislados obtenidos durante cada periodo del estudio (Figuras 118-120).

Resultados

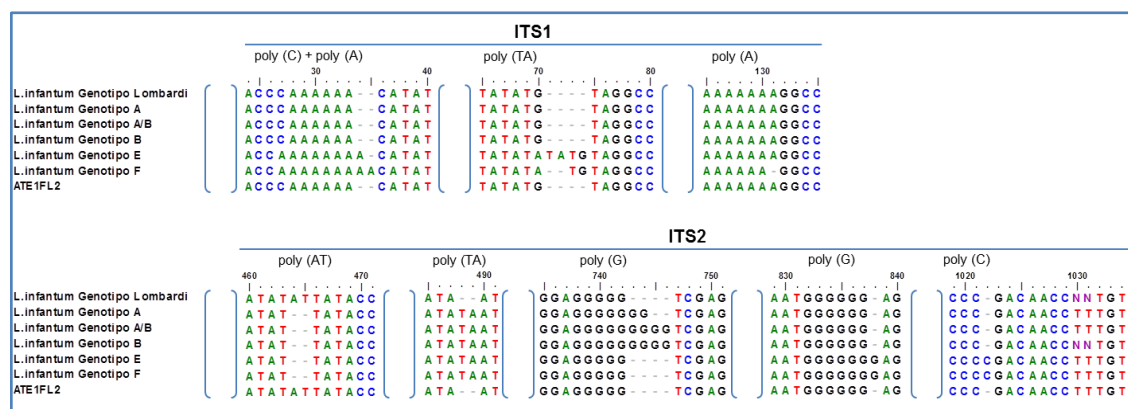


Figura 96. Alineamiento parcial en el que se muestran las diferencias en las regiones polimórficas de los fragmentos de las secuencias ITS1 e ITS2 entre diferentes genotipos de *L. infantum* (genotipo Lombardi (AJ000295); genotipo A (AJ634341); genotipo A/B (AJ634355); genotipo B (AJ000288); genotipo E (AJ634361); genotipo F (AJ634370)) y la secuencia del primer aislado caracterizado en este estudio (ATE1FL2).

4.7. Detección de *L. infantum* mediante métodos moleculares

Para la detección de *L. infantum* se llevaron a cabo tres protocolos de PCR convencional que amplifican dianas diferentes: un fragmento de 120 pb del ADNk, un fragmento de 702 pb del gen *cpb* y un fragmento de 300-350 pb de la región ITS1. En total se analizaron 912 hembras de *P. perniciosus*, de las cuales 308 presentaban sangre en su tubo digestivo. De este total de hembras, 88 fueron positivas a *L. infantum* (9,65%). El porcentaje de hembras infectadas fue mayor entre las hembras con sangre (n=41; 13,31%) que entre las hembras sin sangre (n=47; 7,78%).

En la figura 98 se muestra una representación de los productos de PCR obtenidos tras la amplificación del fragmento de ADNk (Figura 97A), del fragmento del gen *cpb* (Figura 97B) y de la región ITS1 (Figura 97C). Las 88 hembras positivas fueron detectadas mediante la amplificación del fragmento de 120 pb del ADNk. De estas, 73 muestras fueron confirmadas mediante la amplificación del fragmento de 702 pb del gen *cpb* correspondiente a *L. infantum* y 7 mediante la amplificación de la región ITS1.

En relación a las hembras de *S. minuta*, fueron analizadas 33 hembras con sangre y 40 hembras sin sangre, resultando todas ellas negativas a *L. infantum* tras el análisis mediante PCR del ADNk.

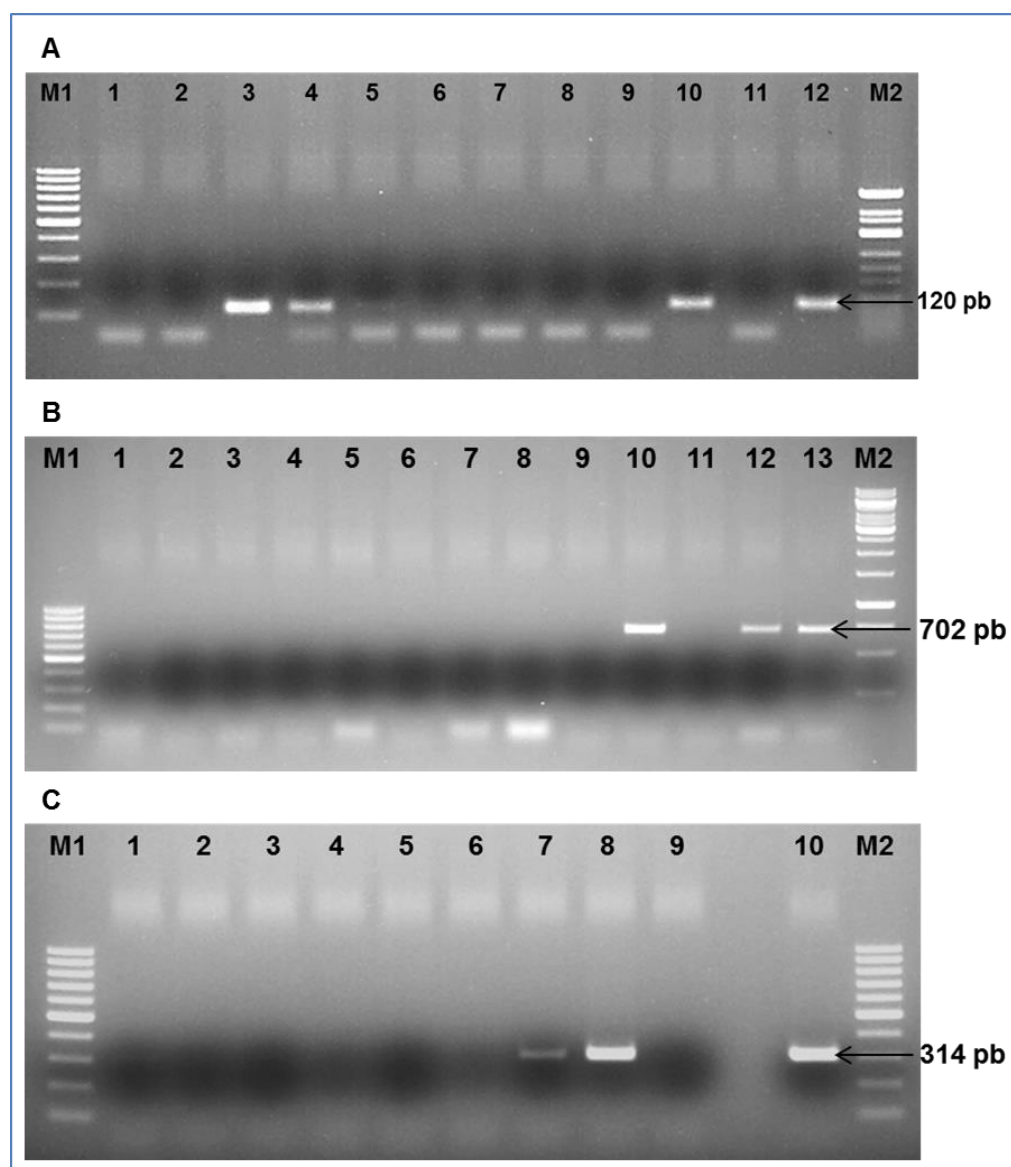


Figura 97. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para la detección de *L. infantum* en flebotomos. **A)** Amplificación del fragmento de ADN_r. M1, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, control negativo de PCR; 2, blanco de extracción; 3-11, ADN de hembras de *P. perniciosus*; 12, control positivo (10 pg de ADN de promastigotes de *L. infantum* JPCM5); M2, marcador de FiX174/*Hinf*I (Biotools®). **B)** Amplificación del fragmento de *cpb*. M1, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, control negativo de PCR; 2-12, ADN de hembras de *P. perniciosus*; 13, control positivo (100 pg de ADN de promastigotes de *L. infantum* JPCM5); M2, marcador de 1 kb (Biotools®). **C)** Amplificación del fragmento de ITS1. M1, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, control negativo de PCR; 2-9, ADN de hembras de *P. perniciosus*; 10, control positivo (1 ng de ADN de promastigotes de *L. infantum* JPCM5); M2, marcador de 100 pb (Biotools®).

4.7.1. *P. perniciosus* positivos a *L. infantum* en cada periodo de muestreo y estación

De las 308 hembras de *P. perniciosus* con sangre analizadas, 100 fueron capturadas en 2012, 92 en 2013 y 116 en 2014. Las tasas de infección fueron disminuyendo a lo largo de los tres años, siendo del 23% (n= 23) en 2012, del 11,11% (n=12) en 2013 y del

Resultados

4,76% (n= 6) en 2014. Estas diferencias entre las tasas de infección en las hembras con sangre, durante los periodos de muestreo, no fueron significativas ($p=0,1200$). En el caso de las hembras sin sangre, la mayor tasa de infección se encontró en el periodo de muestreo de 2013, alcanzando el 10,13% tras detectarse 21 hembras positivas de las 92 analizadas. En 2012, se detectaron 15 hembras de *P. perniciosus* infectadas por *L. infantum* de las 225 analizadas (6,66%). Finalmente, en 2014 se encontró la menor tasa de infección (5,88%), al detectarse 11 hembras positivas de las 187 analizadas. La diferencia en las tasas de infección de las hembras sin sangre no fue significativa entre los tres periodos de muestreo ($p=0,5101$).

En relación a las tasas de infección de las hembras con sangre en cada estación, la tasa media más alta (25,67%) resultó ser la de la estación POL (19 hembras positivas de 74 analizadas), seguida del 13,15% detectado en la estación BOS (15 hembras positivas de 114), del 6,25% en ATE (4 hembras positivas de 64) y del 5,26% en JIC (3 hembras positivas de 57). En la Figura 98 se muestra la variación de las tasas de infección en cada estación a lo largo de los tres años de muestreo, destacando el 66,66% registrado en POL en 2012. El análisis estadístico no evidenció diferencias significativas en las tasas de infección entre estaciones ($p=0,4959$).

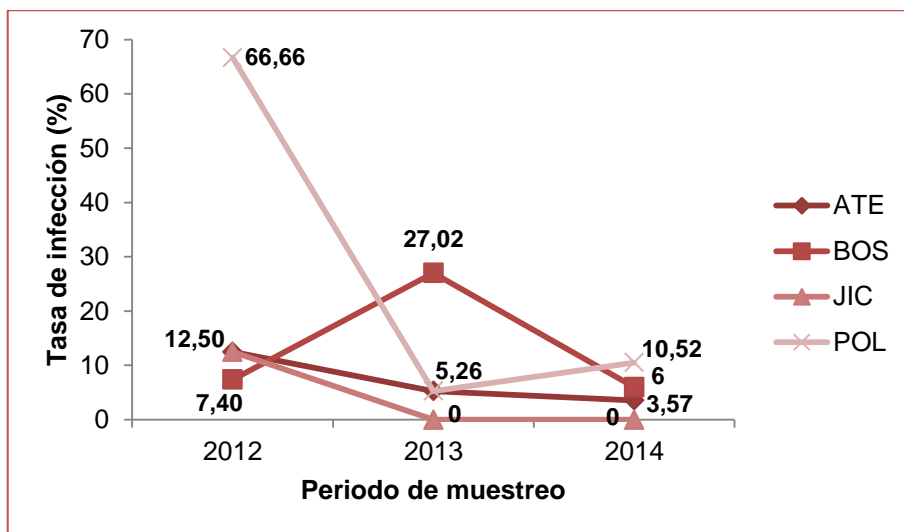


Figura 98. Porcentaje de hembras con sangre positivas a *L. infantum* por estación durante cada periodo de muestreo.

Por otro lado, en relación a las hembras sin sangre, la tasa de infección más alta se encontró también en la estación POL (13,68%; 13 hembras positivas de 95), seguida por BOS (13,04%; 21 hembras positivas de 161), JIC (4,27%; 10 hembras positivas de 234) y ATE (2,63%; 3 hembras positivas de 114). Estas diferencias entre estaciones sí fueron significativas ($p=0,0084$), aunque sin establecerse diferencias entre estaciones concretas tras el análisis de comparación múltiple ($p>0,05$ en todos los casos). Al igual que con las hembras con sangre, las tasas de infección en cada estación mostraron variaciones a lo largo de los tres periodos de muestreo (Figura 99), destacando el 25% de hembras de flebotomo infectadas en POL en 2013.

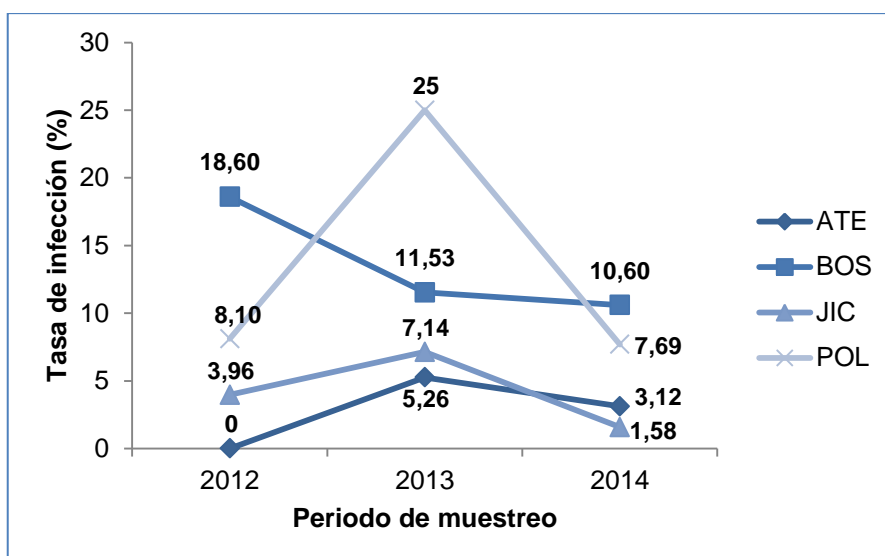


Figura 99. Porcentaje de hembras sin sangre positivas a *L. infantum* en cada estación a lo largo de los tres periodos de muestreo.

4.8. Optimización y validación de una qPCR para la detección y cuantificación de *Leishmania* en *P. perniciosus*

4.8.1. Optimización

Para determinar las condiciones óptimas de la qPCR se realizaron diferentes pruebas en las que se variaron el número de ciclos y la concentración de cebadores. Tras los diferentes ensayos se determinó que un número mayor a 40 ciclos daba lugar a la disminución de la eficacia de la reacción de qPCR y que una concentración de cebadores mayor a 0,1 μ M producía un aumento en la aparición de dímeros. Finalmente las condiciones de reacción establecidas fueron las siguientes: 10 μ l de “Quantimix Hotsplit Easy Kit” (Biotools®), 0,5 μ l de BSA 20 mg/ml (Roche®), cebadores 0,1 μ M, 40 ng de ADN y agua libre de ADNAsas (Sigma-Aldrich®) hasta completar el volumen final de 20 μ l. La desnaturalización inicial fue de 15 min a 95°C seguida de 40 ciclos de 10 s a 95°C, 10 s a 58°C y 30 s a 72 °C.

4.8.2. Curva patrón

Tras el análisis estadístico, no se observaron diferencias significativas entre las tres réplicas de cada una de las curvas patrón realizadas (curva patrón realizada con ADN de promastigotes, $p=0,8981$; curva patrón realizada con ADN de promastigotes al que se añadió ADN extraído de flebotomos mantenidos en el LEM, $p=0,8847$). Además, el análisis comparativo entre las dos curvas demostró que no existían diferencias significativas entre ambas ($p=0,6294$). Los valores Ct promedio y la desviación estándar (DE) de cada una de las diluciones de ambas curvas patrón se muestran en la Tabla 47.

Resultados

Tabla 47. Media de los valores Ct y desviación estándar (DE) de cada una de las diluciones de promastigotes.

Diluciones (promastigotes /ml)	Valor Ct ± DE							
	1	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
Promastigotes	25,99±0,29	22,57±0,15	22,27±0,21	20,81±0,16	17,92±0,30	14,4±0,13	10,91±0,31	7,30±0,15
Promastigotes + ADN flebotomos	25,23±0,57	22,24±0,34	21,53±0,27	20,29±0,28	17,57±0,35	14,03±0,46	10,68±0,24	7,24±0,29

El límite de detección obtenido con ambas curvas fue de 0,001 parásitos/reacción, lo que corresponde a 1 promastigote/ml en la muestra de origen. Considerando que un promastigote de *L. infantum* presenta alrededor de 80,2 fg, sumando el genoma haploide de 69,7 fg y 10,5 fg del material genético del kinetoplasto (Peacock y col., 2007), el límite de detección de esta qPCR fue de 0,08 fg de ADN. En la Figura 100 se muestra un gráfico de adquisición de fluorescencia resultante del análisis de las diluciones seriadas de ADN de promastigotes de *L. infantum*.

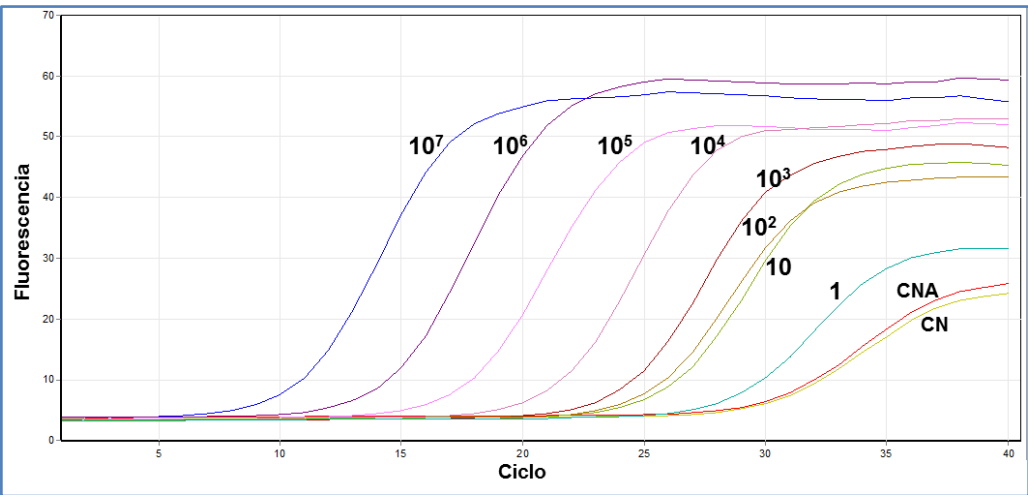


Figura 100. Gráfico de adquisición de fluorescencia obtenido con las diluciones de promastigotes de *L. infantum* (10⁷ promastigotes/ml – 1 promastigote/ml). CNA, control negativo sin ADN; CN, control negativo.

Por otro lado, en ambas curvas patrón se observó una pérdida de linealidad a partir de la dilución 10² promastigotes/ml que provocó una disminución de la eficiencia global de estas reacciones. Este hecho se puede observar en las gráficas de las Figuras 101A y 101B. A pesar de ello, en el análisis de las muestras de ADN de hembras de flebotomo la eficiencia de las reacciones sí se mantuvo dentro de los valores correctos, como se muestra en el apartado 4.8.3.

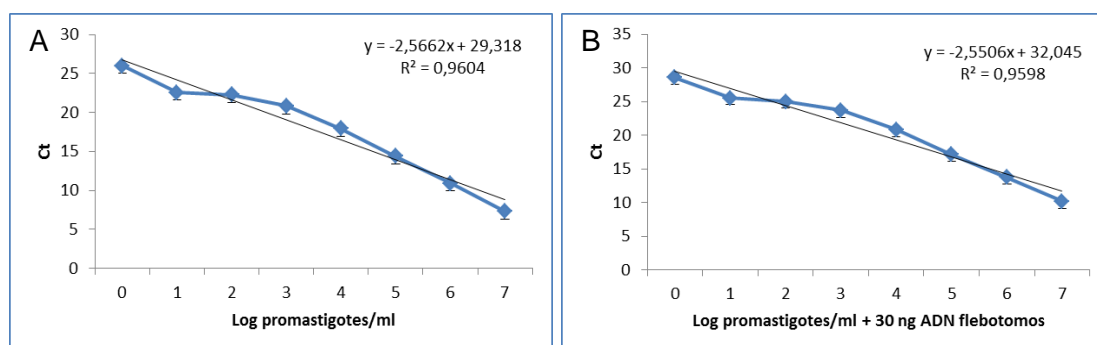


Figura 101. A) Curva patrón obtenida con las diluciones seriadas 1:10 de promastigotes de *L. infantum* (10^7 promastigotes/ml - 1 promastigote/ml). **B)** Curva patrón obtenida con las diluciones 1:10 de promastigotes de *L. infantum* (10^7 promastigotes/ml - 1 promastigote/ml) a las que se añadieron 30 ng de ADN de flebotomos procedentes de la colonia establecida en el LEM (CNM-ISCIII). Ct, ciclo umbral; R^2 , coeficiente de determinación.

4.8.3. Análisis de muestras

En total se analizaron mediante qPCR 135 hembras (2012, n=58; 2013, n=39; 2014, n=38), de las cuales 68 fueron positivas según los métodos de amplificación convencionales explicados anteriormente (apartado 4.7.2). De estas 68 hembras, 35 presentaban sangre en su tubo digestivo (Tabla 48).

	Año							
	2012		2013		2014		Total	
Muestra	-	+	-	+	-	+	-	+
Hembras sin sangre	12	14	10	9	16	10	38	33
Hembras con sangre	9	23	12	8	8	4	29	35
Total	17	37	22	17	24	14	67	68

Tabla 48. Relación de ejemplares de *P. perniciosus* analizados mediante qPCR.

En la Tabla 49 se muestra el resultado de las cargas parasitarias observadas en las hembras de *P. perniciosus* analizadas. Dentro de las hembras con carga parasitaria muy alta se obtuvo una muestra con carga superior a 100.000 parásitos/ml. Se observó que las hembras capturadas en el año 2012 presentaron una carga parasitaria mayor en relación a las hembras capturadas en 2013 y 2014 (Figura 102), aunque esta diferencia no fue significativa ($p=0,7233$).

Carga parasitaria (parásitos/reacción)	Número de flebotomos (%)
Muy alta (>10.000)	11 (16,17%)
Alta (1.000-10.000)	16 (23,53%)
Moderada (10-1.000)	21 (30,9%)
Baja (<10)	20 (29,4%)

Tabla 49. Estimación de la carga parasitaria de *L. infantum* en hembras de *P. perniciosus* mediante qPCR.

Resultados

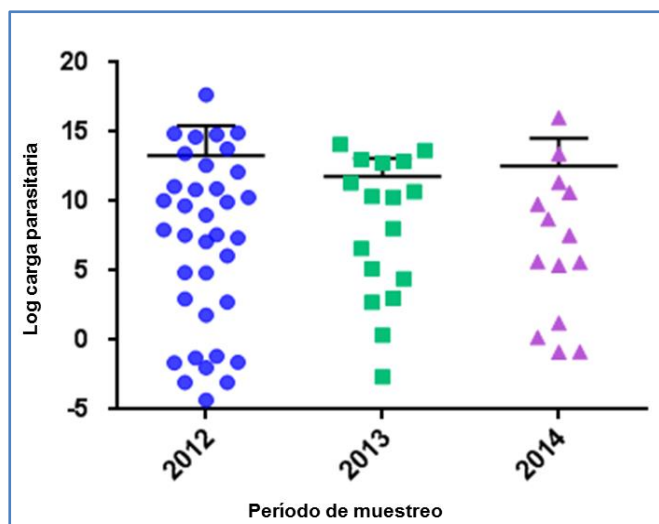


Figura 102. Distribución de la carga parasitaria de *L. infantum* en las hembras analizadas de cada periodo de muestreo. (●) 2012, (■) 2013, (▲) 2014.

En la Figura 103 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en una de las reacciones, donde se puede comprobar que las muestras positivas y negativas se pudieron diferenciar claramente. La eficiencia de las reacciones fue correcta (eficiencia media= $1,06 \pm 0,07$; pendiente media= $-3,2 \pm 0,14$) a pesar de la pérdida de eficiencia observada en las curvas estándar.

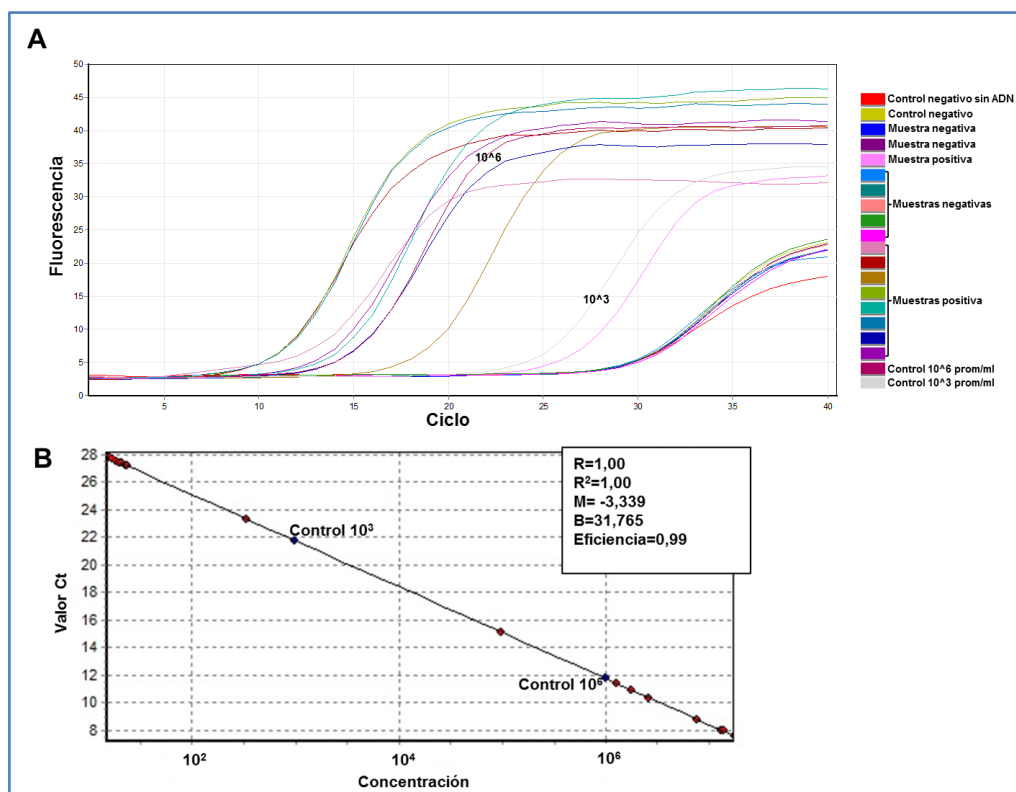


Figura 103. Representación de los resultados del análisis mediante qPCR de hembras de flebotomo. **A)** Gráfico de adquisición de fluorescencia donde se diferencian entre hembras positivas y negativas a *L. infantum*, y controles positivos y negativos. **B)** Concentración de la carga parasitaria (parásito/reacción) de las muestras en relación a los controles positivos. Valores obtenidos en la reacción de qPCR: coeficiente de correlación ($R=1$), coeficiente de determinación ($R^2=1$), pendiente ($M=-3,339$), compensación ($B=31,765$), eficiencia ($0,99$). Ct, ciclo umbral.

Por otro lado se analizó la diferencia en la carga parasitaria estimada entre las hembras con sangre y sin sangre. En el caso de las hembras con sangre, la carga media estimada fue de 8,02 parásitos/reacción, frente a la carga media de 1.580 parásitos/reacción de las hembras que no presentaban sangre (Figura 104). Esta diferencia entre ambos grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$).

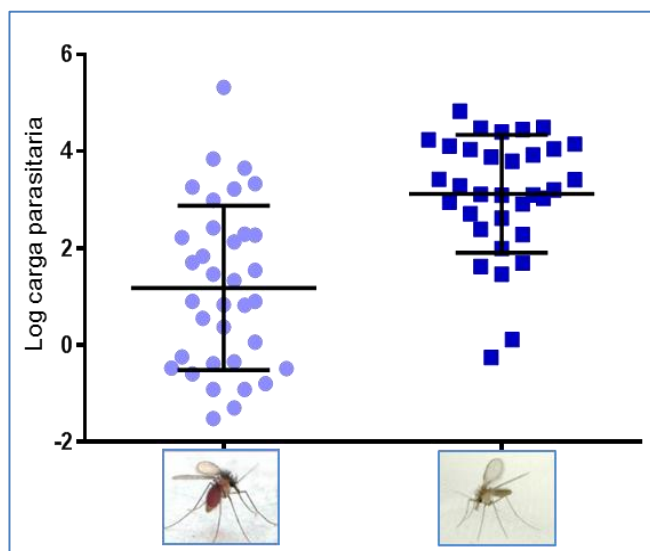


Figura 104. Distribución de las hembras analizadas con sangre (●) y sin sangre (■) en relación a la carga parasitaria determinada mediante qPCR.

4.9. Detección de *Trypanosoma* spp. en *P. perniciosus*

En el análisis molecular mediante amplificación de la región ITS1 para la detección de *L. infantum* en las hembras de *P. perniciosus* se observó la aparición de una banda de alrededor de 480 pb en algunas de las muestras, siendo muy tenue en alguna de ellas, como se puede observar en las Figuras 105A, 105B y 105C. Esta banda se detectó sólo en hembras con sangre en las que la fuente de alimentación había sido sangre de conejo (ver apartado 4.10). Finalmente, se observó que en 20 de las 155 hembras analizadas aparecía esta banda de ≈ 480 pb tras la amplificación de la región ITS1. A continuación se procedió a realizar la amplificación de un fragmento de 940 pb de ARNr SSU en estas 20 hembras, resultando positivas 6 de ellas (Figura 106A y 106B). Además, en dos de estas hembras también se detectó ADN de *L. infantum*.

Resultados

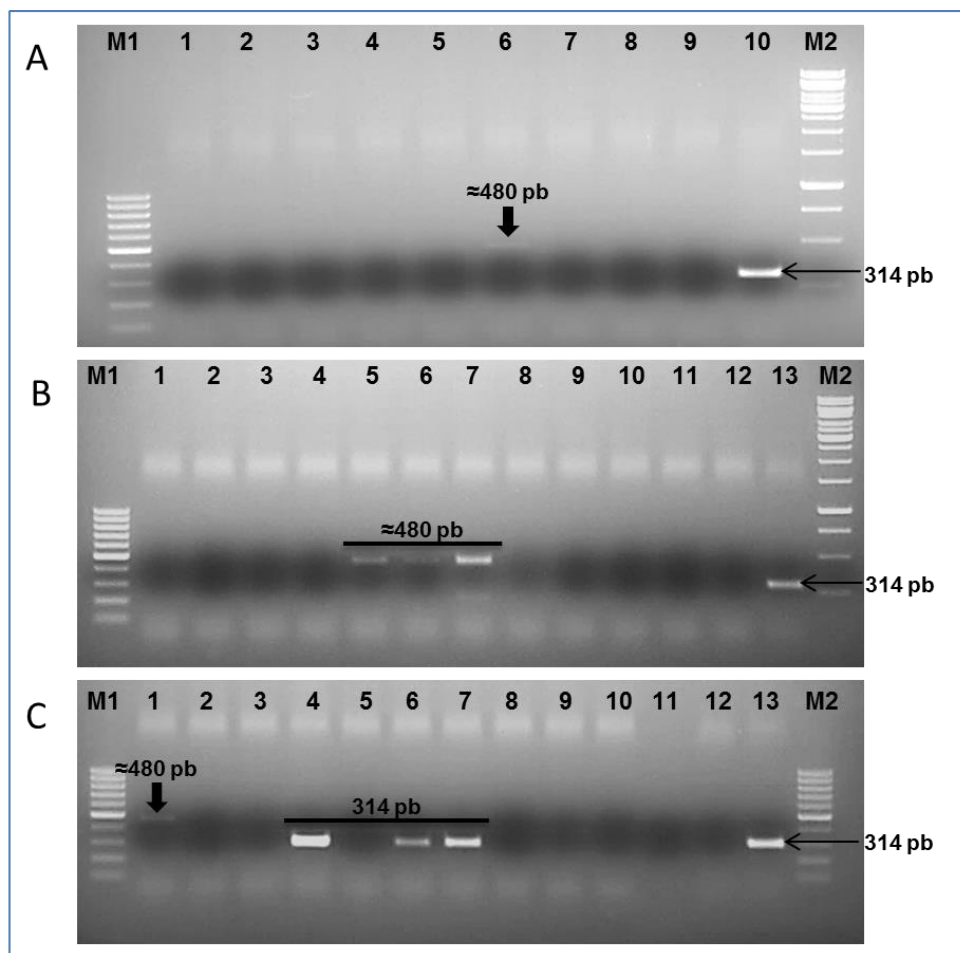


Figura 105. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de la región ITS1 en la que se observan las bandas de ≈ 480 pb (flechas negras). **A)** 1, control negativo de PCR; 2-9, ADN de hembras de *P. perniciosus*; 10, control positivo (1 ng de ADN de cultivos promastigotes de *L. infantum*). **B)** 1, control negativo de PCR; 2-12, ADN de hembras de *P. perniciosus*; 13, control positivo (1 ng de ADN de cultivos promastigotes de *L. infantum*). **C)** 1-12, ADN de hembras de *P. perniciosus*; 13, control positivo (1 ng de ADN de cultivos promastigotes de *L. infantum*). M1, marcador de 100 pb (Biotools®); M2, marcador de 1 kb (Biotools®).

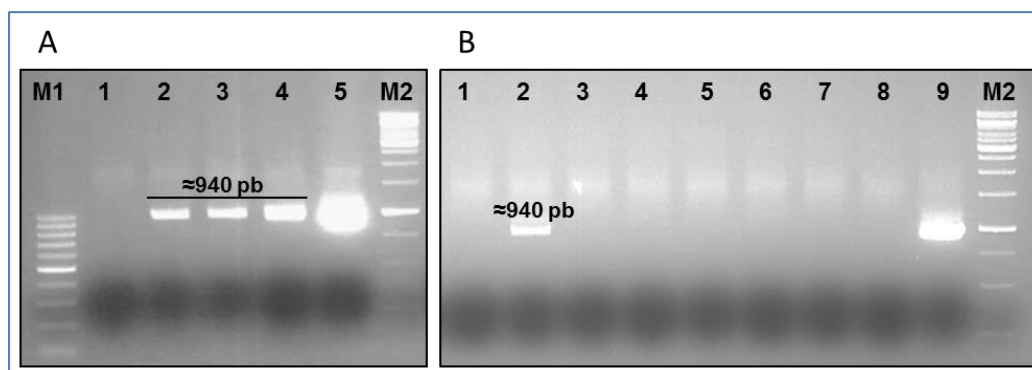


Figura 106. Electroforesis en gel de agarosa tras la amplificación de ARNr SSU en las que se observan bandas de ≈ 940 pb. **A)** 1, control negativo de PCR; 2-4, ADN de hembras de *P. perniciosus*; 5, control positivo (1 ng de ADN de cultivos promastigotes de *L. infantum*). **B)** 1, control negativo de PCR; 2-8, ADN de hembras de *P. perniciosus*; 9, control positivo (1 ng de ADN de cultivos promastigotes de *L. infantum*). M1, marcador de 100 pb (Biotools®); M2, marcador de 1 kb (Biotools®).

4.9.1. Caracterización molecular

Con el fin de identificar la naturaleza de las bandas visualizadas tras la amplificación de la región ITS1 y ARN SSU, se procedió a la purificación de las mismas y a su posterior secuenciación. Seis fragmentos de ITS1 (F24, F25, F27, F44, F47 y F114) y 4 de ARNr SSU (F12, F47, F51 y F114) fueron secuenciados con éxito. Sólo en dos de las 20 muestras (F47 y F114) se consiguió secuenciar tanto el fragmento de ITS1 como de ARN SSU. Una vez editadas y analizadas las secuencias, los primeros análisis mediante BLAST de los fragmentos de la región ITS1 mostraron una identidad del 86-88% con *Trypanosoma otospermophili* y del 86-87% con *Trypanosoma kuseli*. Posteriormente, pudimos comprobar que los fragmentos de la región ITS1 coincidían en un 96-99% con las secuencias de *T. nabiasi* obtenidas a partir de muestras de tejido de conejos capturados en Granada (Merino-Espinosa y col., 2016) (Figura 107). En el caso de los fragmentos de ARNr SSU el análisis mediante BLAST mostró un 100% de similitud con las secuencias de *T. nabiasi* anotadas en la base de datos del Genbank® por Hamilton y col., 2005 (AJ620568 y AJ843896). Se pudo concluir que las bandas obtenidas en las hembras de flebotomo analizadas pertenecían al tripanosomátido *T. nabiasi*. Tanto las secuencias ITS1 como las correspondientes a ARNr SSU de este trabajo fueron anotadas en la base de datos DDBJ, con números de acceso LC339503-LC339508 y LC341261-LC341264, respectivamente (las secuencias completas se encuentran recogidas en el Anexo 2). Al realizar el alineamiento de las secuencias obtenidas, no se detectaron diferencias entre las secuencias de ARNr SSU, pero sí entre las secuencias ITS1. En concreto, las secuencias de la región ITS1 correspondientes a las muestras F25, F47 y F114 presentaron una similitud del 100% entre ellas, y de más del 99,4% con las otras tres (F24, F27 y F44) (Figura 107). Por otro lado, también se compararon las secuencias obtenidas con las secuencias de *T. nabiasi* procedentes de tejidos de conejos capturados en la provincia de Granada (Merino y col., 2016), hallándose diferencias, principalmente en una región poli TG (posición 75-92) y en una región poli AT (posición 217-253). En la primera región, las 6 secuencias de este estudio presentaron 9 repeticiones frente a las 8 de las secuencias de Granada. En la segunda región, se observó mayor variabilidad, entre 9 y 17 repeticiones (Tabla 50). Además, se detectaron varios polimorfismos entre todas las secuencias, como queda reflejado en la Figura 107.

Resultados

Secuencias	Número de repeticiones	
	Región poly TG	Región poly AT
F44 (LC339503)	9	10
F47 (LC339504)		13
F24 (LC339505)		11
F25 (LC339506)		13
F27 (LC339507)		11
F114 (LC339508)		13
Nab-A (LT575228)	8	17
Nab-B (LT575229)		
Nab-C (LT575230)		9
Nab-D (LT575231)		

Tabla 50. Número de repeticiones en las regiones poly TG y poly AT de las secuencias ITS1 de *T. nabiasi* obtenidas en este trabajo y las secuencias anotadas por Merino-Espinosa y col., 2016 (Nab-A, Nab-B, Nab-C y Nab-D).

Por último, se realizó un estudio filogenético mediante un análisis de máxima verosimilitud, tanto de las secuencias de la región ITS1 como de la región ARNr SSU. En el caso de las secuencias de la región ITS1, las secuencias de *T. nabiasi* obtenidas a partir de flebotomos infectados se agruparon junto a las secuencias anotadas por Merino-Espinosa y col., 2016 (LT575228-LT575231) (Figura 108). Por otro lado, las secuencias del fragmento ARNr SSU se asociaron en un mismo grupo junto con las dos secuencias de *T. nabiasi* anotadas por Hamilton y col., 2005 (AJ620568 y AJ843896) (Figura 109).

poly (TG)									
F44 (LC339503)	(...)	TACAA--CCGC(...)	F44 (LC339503)	(...)	TGTGTGTGTGTGTGTGCAA(...)	F44 (LC339503)	(...)	GGAAAAGGTAT(...)	
F47 (LC339504)	(...)	TACAA--CCGC(...)	F47 (LC339504)	(...)	TGTGTGTGTGTGTGTGCAA(...)	F47 (LC339504)	(...)	GGAAAAGGTAT(...)	
F24 (LC339505)	(...)	TACACACCCC(...)	F24 (LC339505)	(...)	TGTGTGTGTGTGTGTGCAA(...)	F24 (LC339505)	(...)	GGAAAAGGTAT(...)	
F25 (LC339506)	(...)	TACAA--CCGC(...)	F25 (LC339506)	(...)	TGTGTGTGTGTGTGTGCAA(...)	F25 (LC339506)	(...)	GGAAAAGGTAT(...)	
F114 (LC339508)	(...)	TACAA--CCGC(...)	F27 (LC339507)	(...)	TGTGTGTGTGTGTGTGCAA(...)	F27 (LC339507)	(...)	GGAAAAGGTAT(...)	
Nab-A (LT575228)	(...)	TACAA--CCGC(...)	F114 (LC339508)	(...)	TGTGTGTGTGTGTGTGCAA(...)	F114 (LC339508)	(...)	GGAAAAGGTAT(...)	
Nab-B (LT575229)	(...)	TACAA--CCGC(...)	Nab-A (LT575228)	(...)	TGTGTGTGTGTGTGTG--CAA(...)	Nab-A (LT575228)	(...)	GGAAAAGGTAT(...)	
Nab-C (LT575230)	(...)	TACAA--CCGC(...)	Nab-B (LT575229)	(...)	TGTGTGTGTGTGTGTG--CGA(...)	Nab-B (LT575229)	(...)	GGAAAAGGTAT(...)	
Nab-D (LT575231)	(...)	CACAC--CCGC(...)	Nab-C (LT575230)	(...)	TGTGTGTGTGTGTGTG--CAA(...)	Nab-C (LT575230)	(...)	GGAAAAGGTAT(...)	
			Nab-D (LT575231)	(...)	TGTGTGTGTGTGTGTG--CAA(...)	Nab-D (LT575231)	(...)	GGAAAAGGTAT(...)	
	34	44		75	95		108	117	
poly (AT)									
F44 (LC339503)	(...)	GCATATATATATATATATAT-----AGT(...)	F44 (LC339503)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	F44 (LC339503)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	
F47 (LC339504)	(...)	GCATATATATATATATATATAT-----AATGT(...)	F47 (LC339504)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	F47 (LC339504)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	
F24 (LC339505)	(...)	GCATATATATATATATATATAT-----AATGT(...)	F24 (LC339505)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	F24 (LC339505)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	
F25 (LC339506)	(...)	GCATATATATATATATATATAT-----AATGT(...)	F25 (LC339506)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	F25 (LC339506)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	
F27 (LC339507)	(...)	GCATATATATATATATATATAT-----AATGT(...)	F27 (LC339507)	(...)	TATAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	F27 (LC339507)	(...)	TATAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	
F114 (LC339508)	(...)	GCATATATATATATATATATATAT-----AATGT(...)	F114 (LC339508)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	F114 (LC339508)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	
Nab-A (LT575228)	(...)	GCATATATATATATATATATATATATATAATGT(...)	Nab-A (LT575228)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	Nab-A (LT575228)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	
Nab-B (LT575229)	(...)	GCATATATATATATATATATATATATATATAATGT(...)	Nab-B (LT575229)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	Nab-B (LT575229)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	
Nab-C (LT575230)	(...)	GCATATATATATATATATATATATATATATAATGT(...)	Nab-C (LT575230)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	Nab-C (LT575230)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	
Nab-D (LT575231)	(...)	GCATATATATATATATATAT-----AATGT(...)	Nab-D (LT575231)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	Nab-D (LT575231)	(...)	TCTAAGTGTTGTGGAAAAAGTAACTTGCCGCTTGAC(...)	
	215			255			262	297	
F44 (LC339503)	(...)	TATATACATA(...)	F44 (LC339503)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	F44 (LC339503)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	
F47 (LC339504)	(...)	TATATACATA(...)	F47 (LC339504)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	F47 (LC339504)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	
F24 (LC339505)	(...)	TATATACATA(...)	F24 (LC339505)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	F24 (LC339505)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	
F25 (LC339506)	(...)	TATATACATA(...)	F25 (LC339506)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	F25 (LC339506)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	
F27 (LC339507)	(...)	TATATACATA(...)	F27 (LC339507)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	F27 (LC339507)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	
F114 (LC339508)	(...)	TATATACATA(...)	F114 (LC339508)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	F114 (LC339508)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	
Nab-A (LT575228)	(...)	TATATATATA(...)	Nab-A (LT575228)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	Nab-A (LT575228)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	
Nab-B (LT575229)	(...)	TATATATATA(...)	Nab-B (LT575229)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	Nab-B (LT575229)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	
Nab-C (LT575230)	(...)	TATATATATA(...)	Nab-C (LT575230)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	Nab-C (LT575230)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	
Nab-D (LT575231)	(...)	TATA--CATA(...)	Nab-D (LT575231)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	Nab-D (LT575231)	(...)	GACTTGGCTTCCTATTTCTAGAGAAGAACGCAGCAAAGTGCGATAAGTGGTATCA (...)	
	351	360		437			491		

Figura 107. Alineamiento parcial donde se señalan las diferencias entre los fragmentos de la región ITS1 de *T. nabiasi* obtenidos en este estudio y los fragmentos anotados por Merino-Espinosa y col., 2016.

Resultados

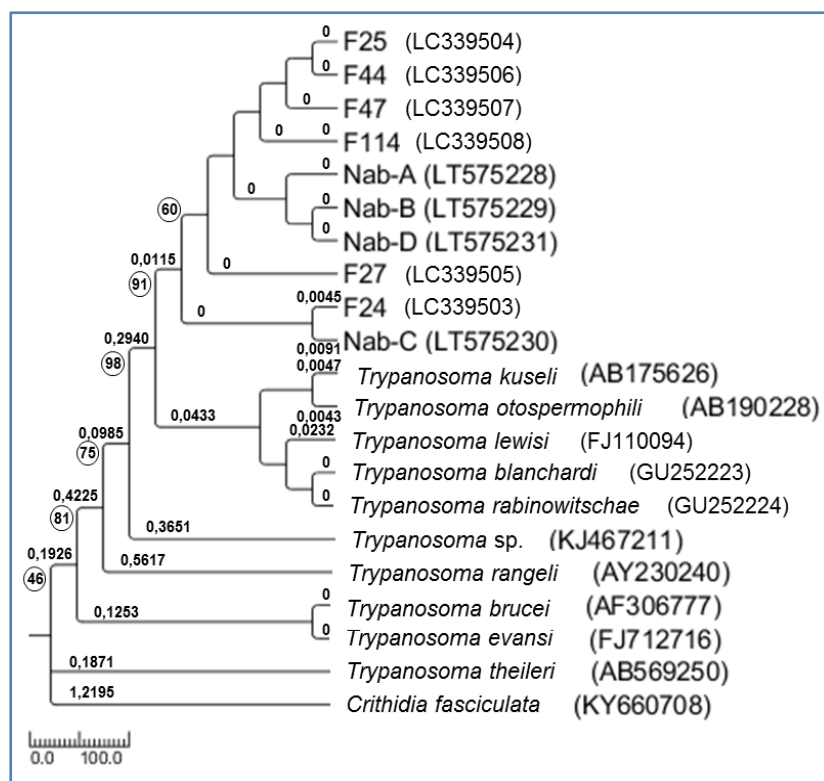


Figura 108. Árbol filogenético con las secuencias ITS1 de *T. nabiasi* y de otros tripanosomátidos anotadas en la base de datos Genbank® (números de acceso entre paréntesis), mediante análisis de máxima verosimilitud (log= -1849,0314). Como taxón externo (*outgroup*) se incluyó una secuencia de *Crithidia fasciculata*. Las longitudes de las ramas, medidas en el número de sustituciones por sitio, se indican junto a cada rama. Los números rodeados por un círculo indican los valores de *bootstrap* (%).

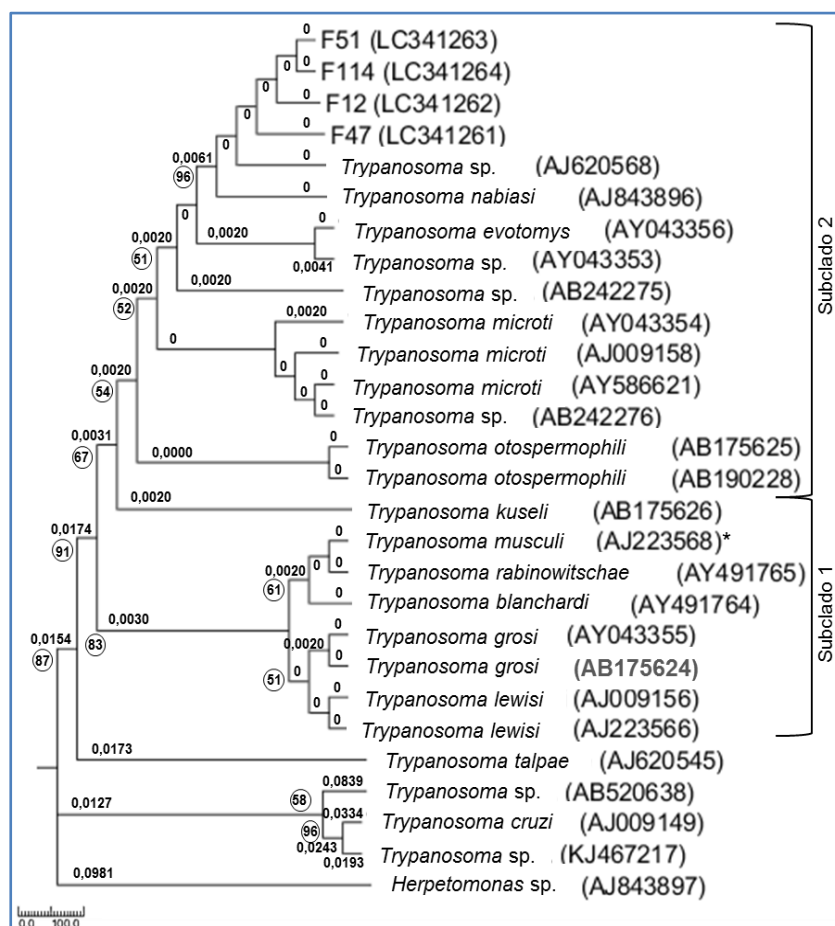


Figura 109. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias ARNr SSU de *T. nabiasi* y secuencias de otros tripanosomátidos anotadas en la base de datos Genbank® (números de acceso entre paréntesis), mediante análisis de máxima verosimilitud (log= -1524,8882). Se incluyó como taxón externo (*outgroup*) una secuencia de *Herpetomonas* sp. Las longitudes de las ramas, medidas en el número de sustituciones por sitio, se indican junto a cada rama. Los números rodeados por un círculo indican los valores de *bootstrap* (%).

4.10. Determinación de preferencias alimentarias en flebotomos

En total se analizaron las preferencias alimentarias de 308 hembras de *P. perniciosus* y 33 hembras de *S. minuta*. De las 308 hembras de *P. perniciosus*, el 84,41% presentaban sangre en fase 2, 3 o 4 del proceso de digestión (ver Figura 57). Finalmente, en 226 hembras de *P. perniciosus* se pudo determinar el origen de la sangre ingerida, lo que supuso un 73,36% de eficacia. Los fragmentos del gen del *cytb* obtenidos tras la secuenciación del producto amplificado fueron examinados y posteriormente analizados mediante el programa BLAST en busca de homologías en la base de datos Genbank®. Los resultados mostraron que algo más de la mitad de las hembras alimentadas presentaban sangre de conejo (n=155; 50,32%), seguidas de aquellas en las que se encontró sangre de liebre (n=59; 19,16%), gato (n=8; 2,59%), humano (n=3; 0,97%) y perro (n=1; 0,32%).

En el análisis mediante BLAST de los fragmentos del *cytb* obtenidos tras la secuenciación se encontraron resultados de dos especies de liebre, *L. granatensis* y *Lepus timidus*. La identificación de *L. timidus* es consecuencia de una introgresión del ADN mitocondrial de esta especie en el genoma de *L. granatensis* (Alves y col., 2003; Melo-Ferreira y col., 2012).

En el caso de las hembras de *S. minuta* (n=33), se pudo identificar el origen de la sangre ingerida en 10 de las hembras (30,30% de eficacia). En todas ellas, el análisis del fragmento del gen *cytb* determinó que correspondía a ADN de salamanguera (*Tarentola mauritanica*). De las 33 hembras, 13 de ellas presentaban sangre recién ingerida (fase 2), 8 se identificaron en fase 3, 5 en fase 4, 6 en fase 5 y 1 en fase 6 (ver Figura 57). La sangre fue identificada en hembras en fase 2 (7/13; 53,84%), fase 3 (1/8; 12,50%) y fase 4 (2/5; 40%). Así mismo, todas las hembras de *S. minuta* con sangre, excepto una, fueron capturadas mediante trampas adhesivas.

4.10.1. Preferencias alimentarias determinadas por periodo y estación de muestreo

El número total de hembras de *P. perniciosus* en las que no fue posible identificar el origen de la sangre ingerida fue de 82 (26,64%). Este porcentaje varió a lo largo de los tres periodos de muestreo: 29%, 23,03% y 25% en 2012, 2013 y 2014, respectivamente. En relación a las diferentes fuentes de alimentación, se observó que el porcentaje de hembras alimentadas de sangre de conejo aumentó a lo largo de los tres años del estudio: 41% en 2012, 50,54% en 2013 y 58,62% en 2014. Por el contrario, las hembras en las que se detectó sangre de liebre descendieron: 28%, 17,58% y 12,93% en 2012, 2013 y 2014, respectivamente. Así mismo, en 2012 se detectó una hembra con sangre humana y otra con sangre de perro; en 2013 se detectó, nuevamente, otra hembra con sangre humana y 8 hembras que se habían alimentado de sangre de gato. Por último, en 2014, se encontró otra hembra alimentada con sangre humana. Los resultados se resumen en la Figura 110.

Resultados

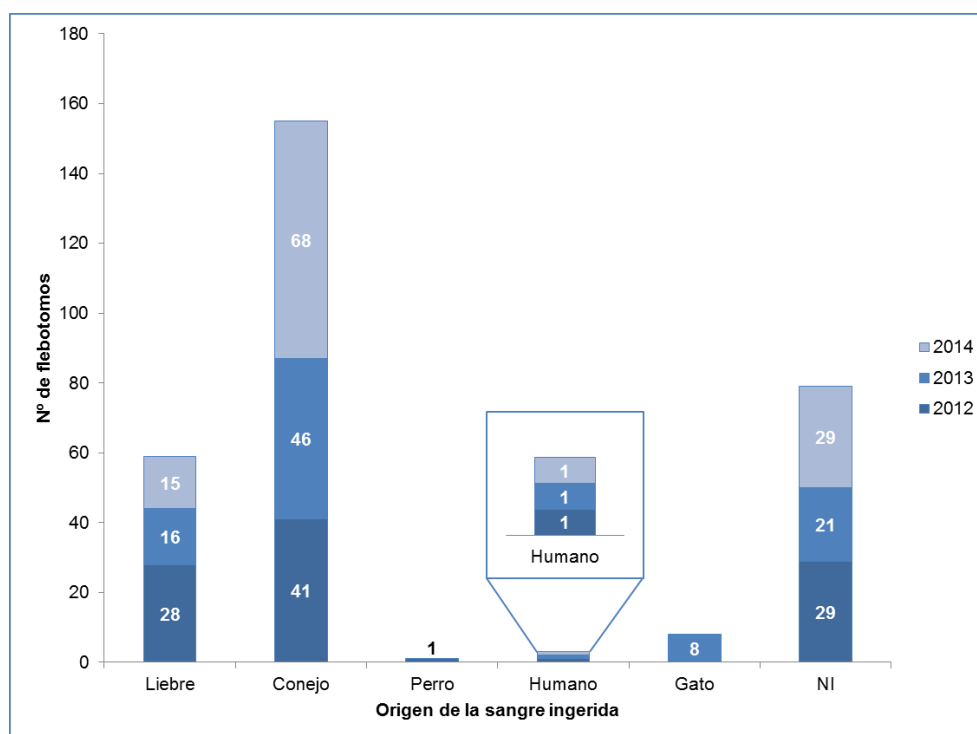


Figura 110. Origen de la sangre ingerida por las hembras de *P. perniciosus* a lo largo de los tres años del estudio. NI: no identificada.

En relación al origen de la sangre ingerida identificada en las hembras de *P. perniciosus* se observaron variaciones dependiendo de la estación en la que habían sido capturadas. Los resultados del análisis del fragmento del gen de *cytb* demostraron que en todas las estaciones la sangre de conejo fue la fuente de alimentación predominante, a excepción de la estación POL, en la que el origen sangre presente en las hembras de *P. perniciosus* correspondió casi exclusivamente a liebre. Resultados opuestos se encontraron en la estación BOS, donde se identificó sangre de conejo en la mayoría de las hembras de *P. perniciosus* analizadas. En la estación JIC se registró una mayor variedad de fuentes de alimentación ya que, además de sangre de liebre y de conejo, se determinaron otras fuentes de alimentación como humano, gato y perro. Estos resultados se encuentran recogidos en la Figura 111.

En cuanto a las hembras de *S. minuta* en las que se identificó con éxito la fuente de alimentación, 9 de ellas fueron capturadas en la estación JIC y una en la estación ATE.

Así mismo, el porcentaje de hembras en las que no se identificó la fuente de alimentación varió entre las cuatro estaciones de muestreo. El menor porcentaje se observó en BOS (14,03%), seguida de ATE (23,43%); mientras que el porcentaje en las estaciones JIC y POL se situó en el 36,84% y el 37,5%, respectivamente.

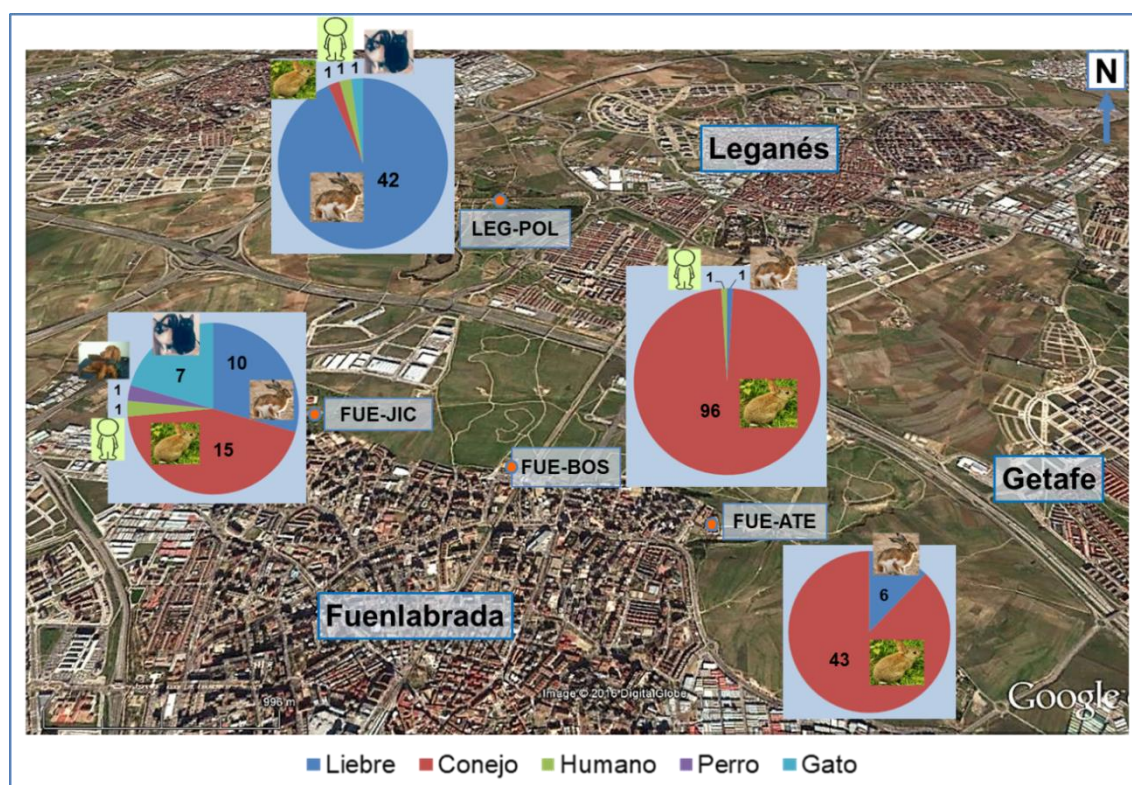


Figura 111. Origen de la sangre ingerida por las hembras de *P. perniciosus* en cada estación de muestreo a lo largo de los tres años del estudio.

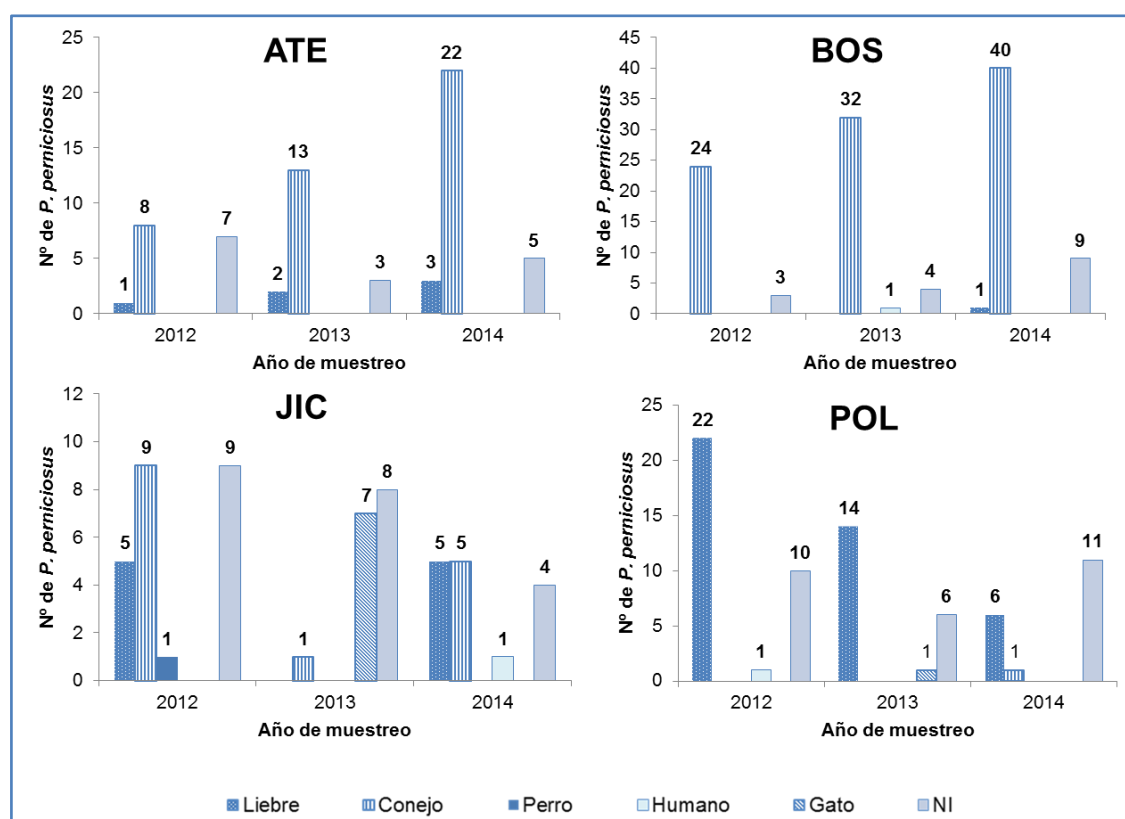


Figura 112. Origen de la sangre ingerida por hembras de *P. perniciosus* en cada una de las estaciones durante los diferentes periodos de muestreo. NI= no identificada.

Resultados

También se observaron diferencias en las preferencias alimentarias de las hembras de flebotomo capturadas en cada una de las estaciones a lo largo los tres periodos de muestreo. En concreto, en las estaciones ATE y BOS se detectó un incremento del número de hembras alimentadas a lo largo de los tres periodos. En la estación JIC, el número de hembras alimentadas de liebre y conejo descendió en el año 2013, aumentando nuevamente en el año 2014. Además, en esta estación sólo se encontraron hembras alimentadas de gato en 2013. Por último, en la estación POL se observó un claro descenso en el número de hembras con sangre ingerida (Figura 112).

4.10.2. Detección de *L. infantum* en hembras con sangre

Los resultados mostraron que ninguna hembra de *P. perniciosus* cuya fuente de alimentación fuera humano, gato o perro resultó positiva a *L. infantum*. Por otro lado, de las 59 hembras alimentadas de liebre, 14 fueron positivas a *L. infantum* (23,73%). Trece de estas hembras fueron capturadas en la estación POL y una en la estación ATE. En el caso de las hembras alimentadas de conejo (n=155), se detectaron 15 positivas a *L. infantum* (9,68%), todas ellas capturadas en la estación BOS, menos un ejemplar capturado en ATE. Por último, de las 82 hembras de *P. perniciosus* en las que no fue posible determinar el origen de la sangre ingerida, se detectaron 12 hembras positivas (14,63%) (Tabla 51).

Tabla 51. Número de hembras con sangre ingerida, identificada y no identificada, en cada periodo en las que se detectó *L. infantum* mediante PCR. NI=no identificada.

		Estación											
		ATE			BOS			JIC			POL		
Año		2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014
Fuente de alimentación	Liebre			1							11		2
	Conejo		1		2	9	3						
	NI	2				1		3			5	1	

4.10.3. PCR-RFLP para la discriminación de las fuentes de alimentación

El estudio *in silico* de los fragmentos de 359 pb del gen *cytb* realizado mediante el programa informático SeqBuilder (DNAS[®] Lasergene) mostró que las enzimas de restricción *HaeIII* y *HinfI* permitían discriminar entre las diferentes fuentes de alimentación de los flebotomos al obtener patrones de bandas específicos (Figuras 113 y 114). La utilización combinada de las dos enzimas permitió diferenciar cada una de las fuentes de alimentación analizadas, ya que el uso de sólo una de las enzimas no fue suficiente para la discriminación entre algunas fuentes de alimentación. Este fue el caso de las secuencias de *Equus caballus* (KF038165.1) y *Gallus gallus* (KF981343.1), y de *Ovis*

aries (JX567811.1, KF977846.1 y AJ971339.1) y *Capra hircus* (GU120393), en las que digestión con el enzima *HaeIII* no permitía su diferenciación, siendo necesaria la digestión con *HinfI* (Tabla 52). Por otro lado, la digestión con *HinfI* de las secuencias de *O. cuniculus* (HQ596486.1) y de *L. granatensis* (JF299042.1) mostraba el mismo patrón de bandas, pero eran diferenciables tras la digestión con *HaeIII* (Tabla 52). Tal como se puede comprobar en las Figuras 114 y 115, además de poder discriminar entre diferentes especies, se encontraron polimorfismos dentro de las poblaciones de conejos y cabras, así como entre las especies de liebres, que daban lugar a patrones de bandas diferentes.

Tabla 52. Secuencias del gen *cytb* en los que fue necesaria la digestión con ambas enzimas de restricción para su identificación.

Secuencia	Patrón de bandas (pb)	
	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
<i>E. caballus</i> (KF038165.1)		45, 80, 234
	7, 20, 105, 159	
<i>G. gallus</i> (KF981343.1)		10, 162, 187
<i>O. aries</i> (JX567811.1, KF977846.1 y AJ971339.1)	75, 125, 159	64, 295
<i>C. hircus</i> (GU120393.1)		163, 196
<i>O. cuniculus</i> (HQ596486.1)	45, 131, 183	
		72, 125, 162
<i>L. granatensis</i> (JF299042.1)	131, 228	

Resultados

<i>HaeIII</i>				
<i>O. cuniculus</i> HG810791.1	45	30	153	145
<i>O. cuniculus</i> HQ596486.1	45		183	131
<i>O. cuniculus</i> FM205927.1	45		183	131
<i>L. granatensis</i> JF299042.1			228	131
<i>L. timidus</i> HM233015.1	75		284	
<i>H. sapiens</i> *			234	105 20
<i>F. catus</i> AY509646.1	74	11	254	20
<i>C. familiaris</i> DQ309764.1			359	
<i>E. caballus</i> KF038165.1	75		159	105 20
<i>O. aries</i> **	75		159	125
a <i>C. hircus</i> GU120393.1	75		159	125
<i>C. hircus</i> FM205715.1	75		230	54
<i>G. gallus</i> KF981343.1	75		159	105 20

Figura 113. Fragmentos de la secuencia de 359 pb del gen *cytb* tras el estudio de los sitios de restricción con la enzima *HaeIII*. a) Fuentes de alimentación de las hembras de flebotomo de Girona y Menorca. (*) Secuencias KM102050.1, KM213250.1 y KJ154700.1; (**) secuencias JX567811.1, KF977846.1 y AJ971339.1.

<i>HinfI</i>				
<i>O. cuniculus</i> HG810791.1		234		125
<i>O. cuniculus</i> HQ596486.1		162	72	125
<i>O. cuniculus</i> FM205927.1		234		125
<i>L. granatensis</i> JF299042.1		162	72	125
<i>L. timidus</i> HM233015.1		234		125
<i>H. sapiens</i> *		162		197
<i>F. catus</i> AY509646.1	45	117	117	79
<i>C. familiaris</i> DQ309764.1	55	9	295	
<i>E. caballus</i> KF038165.1	45	234		80
<i>O. aries</i> **	64		295	
a <i>C. hircus</i> ***		163		196
<i>G. gallus</i> KF981343.1		162	10	187

Figura 114. Fragmentos de la secuencia de 359 pb del gen *cytb* tras el estudio de los sitios de restricción con la enzima *HinfI*. a) Fuentes de alimentación de las hembras de flebotomo de Girona y Menorca. (*) Secuencias KM102050.1, KM213250.1 y KJ154700.1; (**) secuencias JX567811.1, KF977846.1 y AJ971339.1; (***) GU120393.1 y FM205715.1.

Los resultados obtenidos mediante el análisis con programas informáticos de los fragmentos de la secuencia parcial del gen del *cytb* fueron confirmados a través de la amplificación, digestión y posterior electroforesis en gel de agarosa (Figuras 115 y 116), aunque se encontraron ciertas discrepancias. En este sentido, según el estudio *in silico* la alimentación mixta *O. aries*/*C. hircus* sólo podía diferenciarse mediante la digestión del enzima *HinfI*, sin embargo, al visualizar el gel tras la electroforesis de los productos digeridos comprobamos que *HaeIII* también daba un patrón de bandas diferente que

permitía identificar esta alimentación mixta. Además, como se puede observar en las Figuras 115 y 116, aparecieron bandas inesperadas de intensidad baja o muy baja.

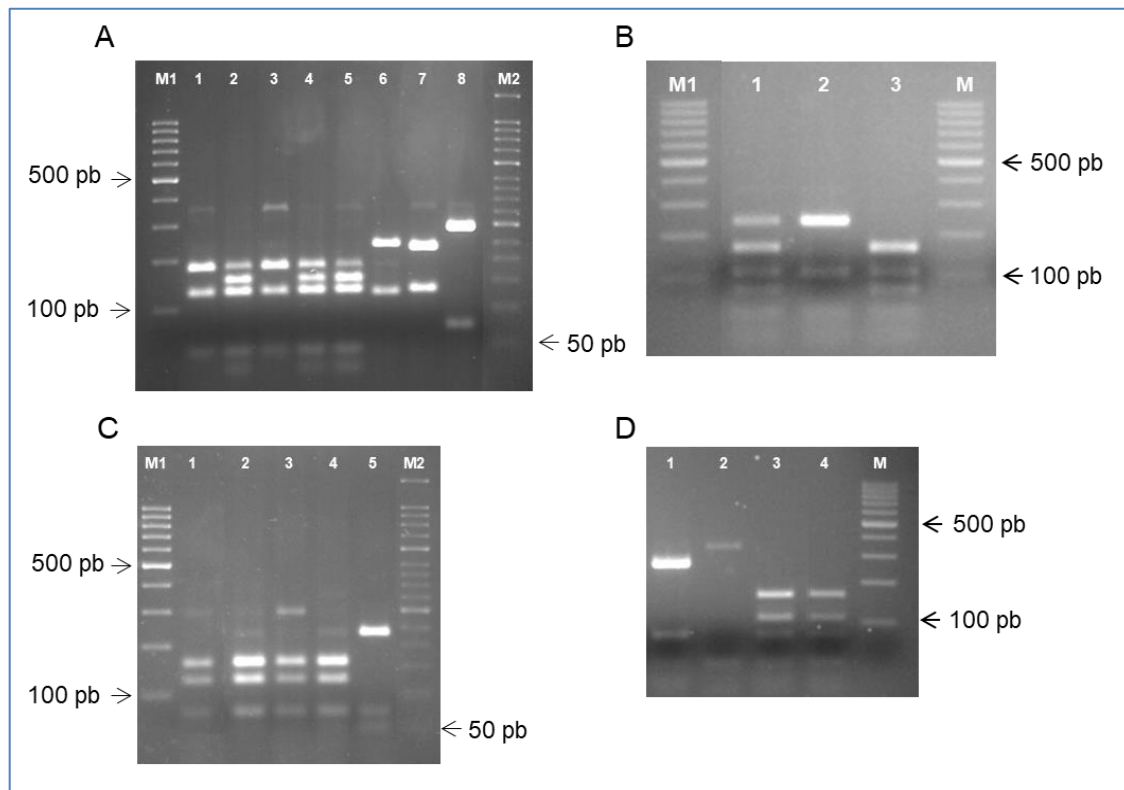


Figura 115. Patrón de bandas obtenido tras la digestión con el enzima de restricción *HaeIII* de los productos amplificados del gen *cytb*. **A)** M1, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, *O. cuniculus* (HQ596486.1); 2, 4 y 5, *O. cuniculus* (HG810791.1); 3, *O. cuniculus* (FM205927.1); 6, *Homo sapiens*; 7, *L. granatensis*; 8, *L. timidus**; M2, marcador de 50 pb (Takara). **B)** M, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, *O. aries/H. sapiens*; 2, *H. sapiens*; 3, *O. aries*. **C)** M1, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, *O. aries*; 2-4: sangre mixta *O. aries/C. hircus*; 5, *C. hircus*; M2, marcador de 50 pb (Takara). **D)** 1, *F. catus*; 2, *C. familiaris*; 3, *E. caballus*; 4, *G. gallus*; M, marcador de 100 pb (Biotools®). *Introgresión de ADN mitocondrial de *L. timidus* en el genoma de *L. granatensis*.

Resultados

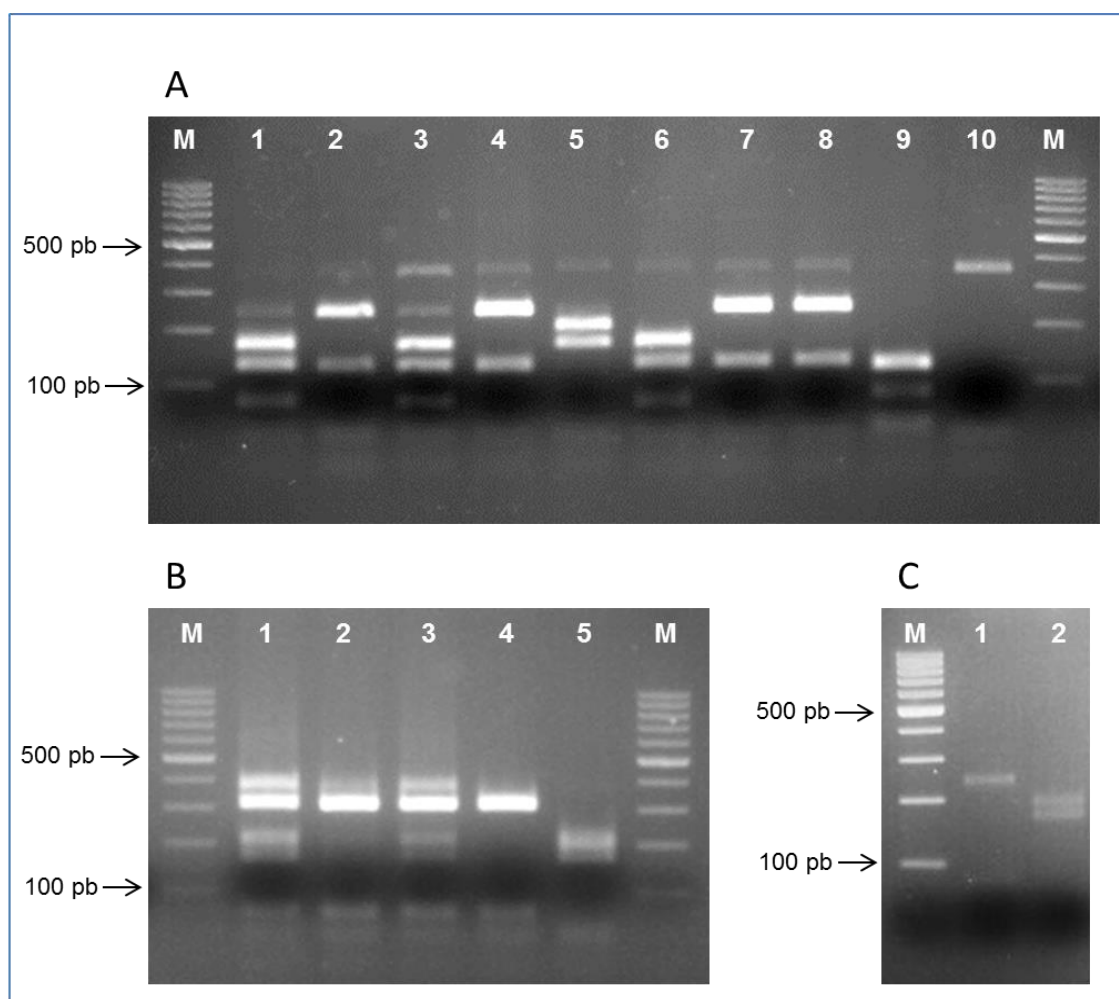


Figura 116. Patrón de bandas obtenido tras la digestión con el enzima de restricción *HinfI* de los productos amplificados de *cytb*. **A)** M, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, *O. cuniculus* (HQ596486.1); 2, 4 y 7, *O. cuniculus* (HG810791.1); 3, *O. cuniculus* (FM205927.1); 5, *H. sapiens*; 6, *L. granatensis*; 8, *L. timidus**; 9, *F. catus*; 10, *C. familiaris*. **B)** M, marcador de 100 pb (Biotools®); 1–3, sangre mixta *O. aries*/*C. hircus*; 4, *O. aries*; 5: *C. hircus*. **C)** M, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, *E. caballus*; 2, *G. gallus*. *Introgresión de ADN mitocondrial de *L. timidus* en el genoma de *L. granatensis*.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores están regidas por un equilibrio entre el patógeno, su vector, el medio ambiente y los hospedadores implicados en el ciclo. Este equilibrio se ve afectado tanto por factores intrínsecos de cada uno de sus componentes como por factores externos que modifican el entorno, pudiendo dar lugar a la disminución o aumento de la transmisión de una enfermedad, a la aparición de un brote o al desplazamiento a otras zonas. El cambio climático, la urbanización o las migraciones son algunas de las causas que afectan a estas enfermedades y a su transmisión. La región suroeste de la CM es un ejemplo de cómo los procesos de urbanización de las últimas décadas del siglo XX, seguidos de la industrialización y acondicionamiento del área con la creación de extensas zonas verdes, han provocado cambios en el entorno que han favorecido la aparición del brote de leishmaniosis humana que desde 2010 ya ha afectado a más de 700 personas (Arce y col., 2013; Ordobás y col., 2017). El diseño y la aplicación de medidas de control de la leishmaniosis en una región endémica o en un brote pasan primeramente por el conocimiento en profundidad de las especies de flebotomos involucradas en la transmisión y de los hospedadores vertebrados implicados en ciclo del parásito. Y es aquí donde se hace imprescindible la realización de estudios entomológicos que aporten la información necesaria.

En esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo una serie de muestreos intensivos de flebotomos en la región del mencionado brote durante los periodos de su actividad anual en los años 2012, 2013 y 2014, cuyos resultados han permitido describir las poblaciones de flebotomos presentes en la región afectada, su dinámica estacional, sus tasas de infección y sus preferencias alimentarias.

5.1. Los flebotomos del área del brote de leishmaniosis humana del suroeste de la Comunidad de Madrid

A lo largo del estudio se encontraron cuatro especies de flebotomos: *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi* y *S. minuta*. Es destacable la ausencia de la especie *P. ariasi*, a pesar de estar presente en otras zonas de la CM (Conesa-Gallego y col., 1999; Gálvez y col., 2010). En un estudio realizado en el área del brote por Tello y col., 2015 tan solo encuentran un ejemplar de esta especie durante las capturas extensivas realizadas los años 2011, 2012 y 2013 en diferentes puntos del área afectada, apoyando los resultados obtenidos. La ausencia de *P. ariasi* podría deberse a que las variables bioclimáticas y ecológicas del área no serían las idóneas para esta especie de flebotomo. En este sentido, numerosos trabajos han descrito que *P. ariasi* tiene una mayor presencia en zonas altas con humedad relativa elevada y temperaturas más suaves (Lucientes-Curdi 1986; Rioux y col., 1986; Martínez-Ortega y Conesa-Gallego, 1987; Gállego y col., 1990; Lucientes y col., 1991; Morillas-Márquez y col., 1991; Aransay y col., 2004; Gálvez y col., 2010; Barón y col., 2011; Rioux y col., 2013; Prudhomme y col., 2015). En relación a las

especies capturadas, *P. perniciosus* fue la especie predominante, seguida de *S. minuta*, coincidiendo nuevamente con los resultados obtenidos por Tello y col., 2015 en la misma zona. Sin embargo, en estudios realizados en otras áreas de la CM se había reportado una mayor abundancia de *S. minuta* frente a *P. perniciosus* (Conesa-Gallego y col., 1999; Gálvez y col., 2010). Este hecho es probablemente debido a la abundancia de liebres y conejos en el área del brote, que proporciona una importante fuente de alimentación a las hembras de *P. perniciosus*, además de encontrar en las madrigueras de los conejos un lugar de cobijo y cría idóneo (Lucientes y col., 2001; Vilas y col., 2012; Arce y col., 2013; Aránguez e Iriso, 2017). Por otro lado, la presencia de *P. papatasi* y *P. sergenti* ha sido testimonial en los tres años, probablemente debido a variables ecológicas poco propicias para estas especies, ya que se encuentran habitualmente en zonas con clima árido o semiárido (Martínez-Ortega y Conesa-Gallego, 1987; Conesa-Gallego y col., 1999).

La alteración del área periurbana, tratada en profundidad en la introducción (apartados 1.5.3.3 y 1.5.3.4), puede ser una explicación al elevado número de *P. perniciosus* recolectado en este trabajo, puesto que estos cambios habrían provocado un aumento de la población de liebres y conejos en este espacio abierto y, como consecuencia, también se habría dado un incremento en la densidad de los flebotomos al disponer de abundante fuente de alimentación (Arce y col., 2013). Esta influencia de los cambios ambientales sobre la abundancia de las especies de flebotomos ha sido reportada en numerosos estudios tanto en Europa como en América y África (Barón y col., 2011; Fernández y col., 2013; Maroli y col., 2013; Barhoumi y col., 2015). Así mismo, este hallazgo es acorde con las observaciones sobre la plasticidad y adaptabilidad a los cambios ambientales de *P. perniciosus* notificadas en Italia (Tarallo y col., 2010). En general, diferentes investigaciones han demostrado que los cambios debido a la acción del ser humano, como la deforestación-reforestación, la construcción de nuevas vías de comunicación y la urbanización, son factores determinantes que perturban el equilibrio de la dinámica hospedador-parásito en las VBD, favoreciendo el incremento de las densidades de las poblaciones de vectores y de hospedadores vertebrados o alterando la composición de especies, lo que propicia la aparición de brotes de enfermedades infecciosas que dan lugar a fenómenos de emergencia o reemergencia (Patz y col., 2000; Aspöck y col., 2008; Ready, 2010; Harhay y col., 2011).

Mediante la colocación de **trampas adhesivas** fueron capturados 28.625 flebotomos (*P. perniciosus*, n=18.446; *S. minuta*, n=10.177; *P. papatasi*, n=2), mientras que con **trampas de luz tipo CDC** se capturó un total de 16.502 ejemplares (*P. perniciosus*, n=15.550; *S. minuta*, n=950; *P. sergenti*, n=2). Estas **diferencias** entre las capturas con las trampas adhesivas y las trampas de luz se deben al hecho de que las primeras son un método de captura por interceptación, en las que los flebotomos son simplemente capturados al encontrarse con ellas durante su desplazamiento; mientras que el segundo método se basa en la atracción ejercida por una fuente lumínica en el que se recogen principalmente especies de flebotomos que presentan fototropismo positivo, tal como se recoge en las revisiones sobre métodos de captura de flebotomos realizadas por Alexander, 2000 y

Alten y col., 2015. Así mismo, en las **trampas de luz** se encontró una gran diferencia entre el número de ejemplares de *P. perniciosus* y de *S. minuta*, lo que en gran medida es debido al mayor fototropismo mostrado por la primera especie (Gállego-Berenguer y col., 1992). Por otro lado, los resultados del presente trabajo contrastan con estudios anteriores llevados a cabo en la CM en los que registraron una densidad de *S. minuta* superior a la de *P. perniciosus* mediante el uso de trampas adhesivas (Conesa-Gallego y col., 1999). Una posible explicación podría ser la extraordinaria población de *P. perniciosus* presente en la zona debido a la convergencia de factores anteriormente mencionados. Además, en este trabajo las **trampas adhesivas** no fueron colocadas en los lugares especificados en otros estudios, como mechinales, orificios o tubos de drenaje en muros, tal como describen las revisiones y trabajos de Alexander, 2000 y Alten y col., 2015, 2016; sino que se colocaron en la base de los troncos de arbustos o árboles, en zonas de vegetación y escombros, junto a grietas en el suelo, junto a muros con alambrada, en las rejillas de los sumideros de la red de drenaje y en las proximidades de madrigueras de conejos, lo que también podría haber influido en las diferencias observadas respecto a anteriores estudios.

En relación al número de ejemplares capturados en cada uno de los **periodos de muestreo**, el menor número de ejemplares se encontró en 2013. Este hecho podría deberse a las condiciones climáticas presentes en la primavera de ese año, en la que se registraron temperaturas medias más bajas y mayores tasas de precipitación, lo que repercutiría en el ciclo biológico de los flebotomos, como ha sido descrito en los estudios entomológicos realizados por Gálvez y col., 2010 en la CM. También se deben tener en consideración los programas de control llevados a cabo desde 2012 en la zona, que incluyeron campañas irregulares de desinsectación que habrían afectado a la población de flebotomos (Vilas y col., 2012; Bernal, 2017; Pablos y col., 2017).

Tras los tres años del estudio, la **densidad media** mediante trampas adhesivas de *P. perniciosus*, único vector de *L. infantum* presente en la zona, fue de 193,60 flebotomos/m². Valores tan elevados de densidad en escasas ocasiones se han registrado en España. Concretamente en Málaga se han reportado densidades de más de 200 flebotomos/m² de ejemplares pertenecientes al género *Phlebotomus* (Morillas-Márquez y col., 1996). Sin embargo, aunque la densidad media en el presente estudio no alcanza ese valor, a lo largo de los tres años se han encontrado meses con valores superiores, alcanzado un valor máximo de 496,63 *P. perniciosus*/m² en agosto de 2013. Estos valores concuerdan con los encontrados por Molina, 1994 y Encinas-Grandes y col., 1988 en la zona de Villaviciosa de Odón y en Salamanca, respectivamente, donde puntualmente llegan a superar los 900 *P. perniciosus*/m². En relación al riesgo de transmisión, Martín-Sánchez y col., 2009 describen en un estudio realizado en Granada que una densidad de *P. perniciosus* igual o superior a 4 flebotomos/m² es un factor que aumenta el riesgo de transmisión de la leishmaniosis canina. Así mismo, estudios realizados en Francia definen como zona de alta transmisión aquella en la que la densidad de *P. ariasi* supere los 20 ejemplares/m² (Rioux y col., 1967), por lo que si se

sigue el mismo criterio, el área estudiada en este trabajo sería una zona con riesgo de transmisión extremadamente elevado. La densidad de flebotomos en cada estación mostró variaciones entre los diferentes periodos del estudio, observándose una disminución generalizada de las capturas, posiblemente gracias a las medidas de control adoptadas en el área del brote a lo largo de los diferentes años y que se detallan en Bernal, 2017. Sin embargo, se observó alguna excepción, como fue el caso de la estación BOS, en la que se registró un aumento en el número de flebotomos, probablemente debido a la extensa población de conejos observada en esta estación durante los tres años en los que se realizaron los muestreos. Este hecho habría influido no sólo sobre la densidad de flebotomos al disponer de un hábitat favorable, sino además de una abundante fuente de alimento.

En cuanto al número de flebotomos capturado entre los dos **puntos de muestreo** de cada estación se observaron diferencias, algunas de ellas significativas (ver Tablas 10 y 11). Ya que los valores registrados de temperatura y humedad relativa entre los dos puntos de muestreo no mostraron diferencias importantes, esta variabilidad en el número de flebotomos capturado pueden ser debidas a las condiciones existentes en el entorno de cada punto, como la presencia de muros, madrigueras o leñeras, tal como se recoge en el apartado 3.2.1, que pueden ser factores relacionados con la densidad de los flebotomos, tal como describen numerosos trabajos llevados a cabo en diferentes puntos de España (Gálvez y col., 2010; Barón y col., 2011; Alcover y col., 2014; Ballart y col., 2014; Risueño, y col., 2017). En el punto 1 de las estaciones ATE y BOS los resultados muestran un mayor número de ejemplares de *P. perniciosus* y *S. minuta* con respecto al segundo punto. Sin embargo, en las estaciones JIC y POL, *P. perniciosus* aparece en mayor número en el punto 2 mientras que la especie *S. minuta* es mayoritaria en el punto 1. Posiblemente la localización de las trampas más o menos cerca de muros haya propiciado la captura de mayor número de ejemplares de *S. minuta*, ya que esta especie muestra preferencia por alimentarse de reptiles, los cuales suelen reposar y cobijarse en grietas de muros y del terreno (Rioux y col., 1967; Martínez-Ortega, 1985; Alten y col., 2015).

Por otro lado, también se encontraron diferencias en las capturas realizadas entre cada una de las **noches de muestreo**, que fueron significativas en octubre de 2012 y 2013, y en junio de 2014. El número de flebotomos fue menor en la primera noche, durante la cual la humedad relativa fue superior, mientras que no se observaron apenas diferencias en los valores de temperatura. Ya que la humedad relativa se ha correlacionado negativamente con la abundancia de flebotomos, es posible que la variación en las capturas entre ambas noches sea debida a la influencia de la humedad ambiental, aunque no se pueden descartar otros factores como por ejemplo el viento, que puede afectar negativamente a las capturas de flebotomos, tal como han descrito estudios entomológicos realizados tanto en la CM (Gálvez y col., 2010) como en otras regiones de España (Risueño y col., 2017) y en el resto Europa (Branco y col., 2013; Prudhomme y col., 2015).

En este estudio se halló que el **porcentaje de machos** de *P. perniciosus* capturado mediante **trampas adhesivas** fue de alrededor del 90%, y del 60% mediante **trampas de luz**. Estos resultados pueden deberse a la existencia de zonas de cría cercanas a los papeles impregnados, a que las hembras de esta especie presentan un fototropismo más acusado o a que se desplazan distancias superiores en búsqueda de animales de los que alimentarse, como indican otros autores (Gállego-Berenguer y col., 1992; Alexander, 2000). Resultados similares se han encontrado en estudios entomológicos llevados a cabo en otras regiones de España como en Granada, donde se recogieron un número muy superior de machos de *P. perniciosus* con trampas adhesivas que de hembras (3222 machos frente a 398 hembras) (Morillas-Márquez y col., 1983), o en Murcia, donde estudios realizados en 2016 reportaron 77,68% de machos capturados mediante trampas adhesivas y 55,40% mediante trampas de luz (Muñoz y col., 2017). En el caso de *S. minuta*, el porcentaje de machos fue mayor con las trampas de luz (63,72%), resultados que se asemejan a los reportados en otros estudios llevados a cabo en España (Conesa-Gallego y col., 1999, Muñoz y col., 2017). Por otro lado, mediante las trampas adhesivas se encontró que la relación machos/hembras fue similar (57,41% de machos), como también se ha observado en estudios entomológicos realizados en Granada, Zaragoza y en Mallorca (Morillas-Márquez y col., 1983; Lucientes-Curdi, 1986; Alcover y col., 2014). Sin embargo, en los trabajos llevados a cabo en la CM por Conesa-Gallego y col., 1999, el número de hembras de *S. minuta* capturado mediante trampas adhesivas fue muy superior al de machos. La captura de un mayor número de hembras de *S. minuta* en comparación con *P. perniciosus*, mediante este tipo de trampas, puede deberse a su preferencia por alimentarse de reptiles que, como ya se mencionó anteriormente, buscan refugio en grietas y orificios de muros, puntos muchos de ellos cercanos a las trampas adhesivas. Además las hembras de *S. minuta* no presentan un fuerte tropismo por la luz como en el caso de *P. perniciosus* (Rioux y col., 1967; Martínez-Ortega, 1985; Alten y col., 2015).

5.2. Dinámica estacional de los flebotomos y su relación con los parámetros climáticos

Los muestreos entomológicos realizados durante tres periodos de actividad anual consecutivos han permitido el estudio de la estacionalidad de las poblaciones de las especies de flebotomo presentes en la zona. La **dinámica estacional de *P. perniciosus*** observada a partir de las capturas realizadas mediante **trampas de luz** mostró un patrón bimodal confluyente en el que se observa la convergencia de picos de abundancia entre junio y septiembre de 2013 y 2014. Sin embargo, en agosto de 2012, mes con menor humedad relativa media y mayor temperatura media, se alcanzó el máximo de capturas, correspondiendo con un patrón monomodal y concidiendo, a su vez, con el análisis estadístico de la correlación entre las capturas de flebotomos y los parámetros bioclimáticos. En estudios entomológicos realizados en Murcia también han encontrado este tipo de patrón, aunque el pico de flebotomos se registra en julio (Muñoz y col., 2017;

Risueño y col., 2017). En el caso de los trabajos llevados a cabo en Extremadura por Bravo-Barriga y col., 2016a, los resultados en 2012 fueron compatibles con un patrón bimodal confluyente con picos en junio y agosto, mientras que al año siguiente se registró un solo máximo de *P. perniciosus* en agosto. Por otro lado, en el presente trabajo el número máximo de capturas de 2013 y 2014 se encontró en septiembre, aunque no se observó ninguna correlación significativa con los valores climáticos registrados, por lo que otros parámetros como el viento, la temperatura o la humedad relativa de los días previos al muestreo pueden haber tenido mayor influencia en la abundancia de flebotomos encontrada en estos dos años, tal como señalan otros estudios realizados en Europa (Gálvez y col., 2010; Alten y col., 2016; Risueño y col., 2017). Estas discrepancias entre la dinámica estacional y los parámetros climáticos también se ha visto reflejada en los estudios de correlación pues en algunos casos se invirtieron los índices (ver Tablas 35 y 40), reflejando la posible influencia de otros factores diferentes a los analizados en este trabajo, como ya se ha mencionado anteriormente. En cuanto a las capturas de *P. perniciosus* con **las trampas adhesivas** también se determinó un patrón bimodal confluyente en 2012 y 2013, mientras que en 2014 se observó el pico de capturas en septiembre. Al igual que con las trampas de luz, los resultados de 2012, con máximos en junio y agosto, coincidieron en mayor medida con los análisis de correlación respecto a los resultados de 2013 y 2014. Este tipo de patrón bimodal confluyente, predominante en *P. perniciosus*, también ha sido descrito en otros estudios llevados a cabo en la cuenca mediterránea (Alten y col., 2016), y es muy similar al patrón bimodal previamente reportado en estudios entomológicos llevados a cabo en España (Lucientes-Curdi y col., 1991; Morillas-Márquez y col., 1983; Martínez-Ortega y Conesa-Gallego, 1987b; Muñoz y col., 2017).

En el caso de la **dinámica estacional de *S. minuta***, las capturas mediante **trampas de luz** no fueron lo suficientemente significativas como para poder establecer un patrón bien definido. Sin embargo, con las **trampas adhesivas** sí se observa un claro pico en agosto de cada periodo, exhibiendo un modelo monomodal. Este mismo modelo fue detectado en las capturas de *S. minuta* en estudios entomológicos realizados en Francia, en los que el número mayor de ejemplares fue descrito en julio de 2011 y 2012 y en agosto de 2013 (Prudhomme y col., 2015). En el presente estudio, agosto fue el mes con los valores más elevados de temperatura y los más bajos de humedad relativa, coincidiendo así con los análisis de correlación cuyos resultados muestran una relación positiva frente a la temperatura y negativa frente a la humedad relativa. Además, los análisis de correlación mostraron índices mayores entre los parámetros climáticos y *S. minuta* que frente a *P. perniciosus*, lo que se ha visto reflejado en los resultados obtenidos. Correlaciones similares entre la humedad relativa y la temperatura han sido previamente reportadas en estudios entomológicos realizados en la región mediterránea (Gálvez y col., 2010; Prudhomme y col., 2015; Risueño y col., 2017; Tsirigotakis y col., 2018). Otros estudios, sin embargo, han encontrado correlaciones negativas entre la temperatura y las capturas de flebotomos (Bravo-Barriga y col., 2016a).

En relación a las **fluctuaciones estacionales de hembras y machos** a lo largo de los tres periodos de muestreo, los machos de ambas especies siguieron la misma dinámica que la población total. Sin embargo, en los muestreos realizados mediante trampas adhesivas se observó que en agosto de 2012 y 2013 mientras que la densidad de los machos de *P. perniciosus* aumentaba, la densidad de las hembras disminuía. Esta misma evolución se encontró en *S. minuta* en septiembre de 2014. De la misma manera, en las capturas realizadas con trampas de luz en el año 2012 se observó un pico de hembras de *P. perniciosus* en julio, mientras que el de los machos se observó en agosto. En los otros dos años de muestreo, el número de hembras y machos evoluciona de manera pareja. En relación a las capturas de *S. minuta*, se observó una discrepancia en la dinámica de hembras y machos durante 2014, mostrando los machos un patrón bimodal con picos en julio y septiembre, mientras que el número de hembras fue muy similar en julio y agosto, sin mostrar un máximo bien diferenciado. Debido a que no se ha encontrado una relación significativa con los parámetros climáticos estudiados que pudiera explicar estas discrepancias en la dinámica de machos y hembras de esta especie, otros factores pueden haber afectado a la población de flebotomos, como la distancia de las trampas a los lugares de cría, la diferencia en la actividad nocturna, cambios en las condiciones climáticas (temperatura, humedad relativa, viento) presentes en las diferentes franjas horarias y la influencia del entorno. En relación a estas variaciones, algunos estudios realizados en diferentes puntos de Europa han encontrado que la actividad de las hembras es mayor desde las 11 de la noche hasta las 2 de la madrugada (Alten y col., 2016). Así mismo, estudios entomológicos llevados a cabo en Etiopía han constatado que la actividad nocturna de las hembras de flebotomo presentaba variaciones dependiendo del tipo de hábitat donde se encontraran localizadas las trampas (rural, presencia de refugios de animales o cercanía de una determinada especie de árbol) (Lemma y col., 2014), así como de la fase lunar presente en el momento del muestreo (Grebresilassie y col., 2015).

5.3. Identificación de las preferencias alimentarias de los flebotomos del área del brote

La identificación del origen de la sangre ingerida por las **hembras de *P. perniciosus*** capturadas en el área del brote muestra que las fuentes de alimentación mayoritarias son la sangre de **conejo** (50,32%) y de **liebre** (19,16%), confirmando los primeros estudios sobre preferencias alimentarias en flebotomos realizados en la zona (Jiménez y col., 2013). Además, los estudios de xenodiagnóstico directo llevados a cabo en liebres y conejos capturados en el foco han puesto de manifiesto que estos lagomorfos son capaces de transmitir el parásito a los flebotomos y que juegan el papel de reservorios en el foco (Molina y col., 2012; Jiménez y col., 2014). Más aún, se ha demostrado la existencia en esta zona de un alto porcentaje de liebres y conejos infectados por *L. infantum* mediante detección molecular del parásito en bazo y piel (Chicharro y col.,

2017a), la presencia de altos niveles de seroprevalencia de la leishmaniosis en liebres y conejos (Moreno y col., 2014) y una alta exposición de estos animales a las picaduras de *P. perniciosus* (Martín-Martín y col., 2014). Todos estos datos han demostrado la hipótesis inicial de la existencia de un ciclo silvestre de transmisión de la leishmaniosis en los parques del área del brote, independiente del ciclo doméstico clásico, con el perro como reservorio principal (Molina y col., 2012; Jiménez y col., 2014). Además, diversos estudios realizados en otras áreas de Madrid y en otras regiones de España destacan la implicación de liebres y conejos en el ciclo silvestre de *L. infantum* en el país (Ruiz-Fons y col., 2013; Díaz-Sáez y col., 2014; García y col., 2014; Ortega y col., 2017). La situación concreta del brote registrado en la región suroeste de la CM parece haber sido favorecida por los cambios del uso del suelo sufridos en su entorno, pasando de tener una utilización preferentemente agrícola a un uso industrial y el acondicionamiento de zonas verdes para disfrute de la población (Vilas y col., 2012; Arce y col., 2013; Aránguez e Iriso, 2017). De esta manera, la población de liebres y conejos se ha visto restringida a un área con unas condiciones muy propicias para su reproducción en ausencia de depredadores, lo que ha dado lugar a un sensible aumento de la densidad de flebotomos. Así mismo, los resultados hallados sobre las preferencias alimentarias de los flebotomos en el área del brote coinciden con estudios previos que han demostrado la apetencia de *P. perniciosus* por la sangre de conejo (Killick-Kendrick y Killick-Kendrick, 1991; Benito de Martín y col., 1994; Volf y Volfova, 2011). Por otro lado, también se ha identificado sangre de gato (2,59%), de humano (0,97%) y de perro (0,32%) en las hembras de *P. perniciosus* recolectados, poniendo así de manifiesto su predisposición a alimentarse de aquellos animales disponibles en su hábitat, confirmando así el comportamiento oportunista de esta especie, tal como han reflejado otros estudios realizados en la cuenca mediterránea (Botet-Fregola, 1991; Bongiorno y col., 2003; Rossi y col., 2008; Maia y col., 2015; Bravo-Barriga y col., 2016a; González y col., 2016b).

En el caso de las **hembras de *S. minuta***, la identificación del origen de la sangre mostró que la salamanquesa es la principal fuente de alimentación. Este hallazgo concuerda con la información existente que recoge la preferencia de las especies del género *Sergentomyia* por animales de sangre fría, como reptiles y anfibios (Lewis, 1987; Lewis y Dyce, 1988). Sin embargo, en los últimos años algunos estudios han detectado ADN de otros vertebrados, incluido el ser humano, en hembras de diferentes especies de *Sergentomyia* (Berdjane-Brouk y col., 2012; Maia y col., 2015; Azizi et al., 2016; Bravo-Barriga y col., 2016b; Senghor y col., 2016; Karakuş y col., 2017; Siripattanapipong y col., 2018). También se ha detectado sangre humana y de otros mamíferos en hembras de *S. minuta* capturadas en el área del brote y analizadas en el marco de los trabajos realizados en el programa de vigilancia entomológica llevado a cabo por la CM (González y col., 2016b). La presencia en *Sergentomyia* de sangre de mamíferos, junto con la presencia de ADN de especies de *Leishmania* patógenas de estos en diversos estudios entomológicos realizados en países del Viejo Mundo, está cambiando la percepción que se tiene de estas especies como únicos vectores de sauroleishmanias (Mutinga y col.,

1994; Mukherjee y col., 1997; Campino y col., 2013; Jaouadi y col., 2015; Ayari y col., 2016; Maia y Depaquit, 2016; Senghor y col., 2016; Pereira y col., 2017).

En total se identificó el origen de la sangre en el 73,36% de las hembras de *P. perniciosus* analizadas. Esta eficacia es inferior a la obtenida en otros estudios en los que se identificó el origen de la sangre en más del 90% de las hembras (Bongiorno y col., 2003; Valinsky y col., 2014; Bennai y col., 2018), utilizando técnicas de identificación diferentes a la de este trabajo. En cambio, el porcentaje fue similar o superior a los resultados reportados por otros autores utilizando la misma metodología basada en la amplificación y posterior secuenciación de un fragmento del gen del *cytb* (Svobodová y col., 2009; Branco y col., 2013; Es-Sette y col., 2014; Maia y col., 2015; Bravo-Barriga y col., 2016a; Paternina y col., 2016). La eficacia en la identificación de la sangre ingerida por hembras pertenecientes a la especie *S. minuta* fue bastante inferior (30,30%), porcentaje ligeramente superior al 20% obtenido por Maia y col., 2015 en estudios llevados a cabo en Portugal, en los que siguieron la misma metodología. El análisis de la procedencia de la sangre presente en el tubo digestivo de artrópodos se enfrenta a diversas dificultades como la posible presencia de inhibidores ligados al grupo hemo, el elevado contenido de proteínas presente en la cutícula quitinosa de los insectos, la cantidad de sangre presente y su grado de digestión (Al-Soud y Rådström, 2001; Velo y col., 2005; Casaril y col., 2017). En este sentido, en el caso de las *S. minuta*, solamente 13 de las 33 hembras analizadas presentaban sangre recientemente ingerida, lo que sumado a las dificultades antes mencionadas podrían ser la causa de la baja eficiencia en la identificación del origen de la sangre.

La presencia de sangre de liebre en hembras de *P. perniciosus* alimentadas fue mayoritaria en la estación situada en el parque de Polvoranca (POL), mientras que en las estaciones BOS y ATE se encontró que la mayoría de las hembras presentaban sangre de conejo. Este resultado posiblemente sea consecuencia de la **segregación** de ambos lepóridos favorecida por la existencia de barreras físicas como autovías y vías ferroviarias y de los taludes que las acompañan. En el CEA de Bosquesur se pudo comprobar, a lo largo de las visitas llevadas a cabo durante los muestreos, la existencia de una elevada cantidad de madrigueras de conejo a lo largo del entarimado del recinto y en los setos de matorrales que lo rodean. Por otro lado, en la estación JIC se encontró una mayor variedad de fuentes de alimentación (conejo, liebre, gato, humano y perro) debido a que se localiza junto al núcleo urbano. En las inmediaciones de las estaciones JIC y POL se observaron algunas colonias de gatos, aunque su número no es relevante si se compara con la población de conejos y liebres, lo que se ha tenido su reflejo en los resultados obtenidos.

A lo largo de los tres años de estudio se observó un aumento en el porcentaje de hembras de *P. perniciosus* alimentadas de sangre de conejo, mientras que el de hembras alimentadas de sangre de liebre disminuyó. Este hallazgo puede ser debido a las medidas de actuación en la región con el fin de controlar la población de estos lepóridos.

La captura de liebres resulta más eficaz y sencilla debido a que no construyen madrigueras y sólo encaman en la superficie del terreno, al contrario que los conejos, por lo que las acciones de control de estos últimos plantean mayores dificultades y su eficiencia podría haberse visto afectada (Vilas y col., 2012; Bernal, 2017; De Pablos y col., 2017).

Por otro lado, el **protocolo de PCR-RFLP del *cytb*** optimizado en este trabajo ha proporcionado una herramienta eficaz para la discriminación del origen de la sangre ingerida por las hembras de flebotomo, siendo capaz de diferenciar incluso entre especies de animales próximas como liebres y conejos y, sobre todo, identificar las alimentaciones mixtas. La utilización de más de un enzima de restricción añade precisión a la técnica, tal como han señalado Steuber y col., 2015 en su trabajo sobre la identificación de la sangre ingerida por moscas tsé-tsé. El estudio *in silico* del patrón de bandas RFLP producido por *HaeIII* y *HinfI* fue confirmado experimentalmente y permite discriminar entre los fragmentos de 359 bp del gen *cytb* de todos los vertebrados analizados. Además, el patrón de bandas diagnósticas obtenido muestra diferencias intraespecíficas, como es el caso de las liebres *L. granatensis* y *L. timidus*, apareciendo en la primera la secuencia del *cytb* de esta segunda especie en España, debido a un proceso de introgresión génica (Alves y col., 2003; Melo-Ferreira y col., 2012). Por otro lado, también se observaron diferencias en el patrón de fragmentación de las secuencias de conejo, debidas al polimorfismo presente dentro de la especie, previamente reportadas en un estudio sobre filogeografía del conejo en la Península Ibérica (Branco y col., 2000). Además, la utilización de patrones de bandas diagnósticas puede ser una alternativa a la secuenciación, ya que esta segunda técnica es mucho más costosa y no se puede llevar a cabo en algunos laboratorios por falta de medios.

La coamplificación de los pseudogenes de la secuencia del *cytb* es probablemente la causa de la aparición de algunas bandas débiles inesperadas, observadas en los geles de electroforesis, como ha sido sigerido por otros autores (Partis y col., 2000).

Por otro lado, la lectura de los electroferogramas en los casos de alimentaciones mixtas puede resultar compleja, sobre todo en aquellos casos en los que aparecen picos inespecíficos que complican su identificación. Otras técnicas como el ELISA y la PCR-RLB también permiten la identificación de alimentaciones mixtas mediante la utilización de diferentes antígenos y sondas (Colmenares y col., 1995; Rossi y col., 2008; Abbasi y col., 2009). Sin embargo, con los métodos de ELISA se observan frecuentemente reacciones cruzadas entre especies cercanas (Colmenares y col., 1995), problema también presente en la PCR-RLB, en la que además es difícil optimizar el diseño y la aplicación de sondas específicas para un gran número de hospedadores diferentes (Abbasi y col., 2009). Como alternativa, la metodología PCR-RFLP muestra un sencillo patrón de bandas analizable. Concretamente, en este estudio se identificaron alimentaciones mixtas en cuatro hembras de flebotomo (un hembra de *P. ariasi* y 3 hembras sin identificar), todas ellas procedentes de Girona, correspondiendo a las

muestras cedidas por la Dra. Montserrat Gállego. Por un lado se encontró sangre de humano y oveja en una misma muestra y, tanto la enzima de restricción *HaeIII* como *HinfI*, generaron un patrón diferencial que permitió distinguirlas (75, 125, 159/20, 105, 234 pb mediante el enzima *HaeIII* y 64, 295/162, 197 pb mediante *HinfI*) (ver Figuras 113 y 114). En el caso concreto de las alimentaciones mixtas de cabra y oveja encontradas en una hembra de la especie *P. ariasi* y dos hembras no identificadas, el estudio *in silico* indicó que sólo *HinfI* discriminaba entre las dos especies (ver Figuras 113 y 114). Aun así la visualización del patrón de bandas tras la digestión con ambas enzimas de restricción mostró un patrón diagnóstico que permitió identificar la alimentación mixta (ver Figuras 115 y 116). Esta discrepancia entre el estudio bioinformático y la visualización de patrones de bandas puede ser debida al polimorfismo en la secuencia de nucleótidos, como se explicó anteriormente (Branco y col., 2000). La técnica PCR-RFLP del *cytb* optimizada confirma, por tanto, los resultados obtenidos previamente mediante la PCR convencional seguida de la secuenciación del fragmento de 359 pb de *cytb*. Es de destacar que entre las hembras capturadas a lo largo del presente estudio no se han encontrado alimentaciones mixtas, aunque en los trabajos englobados en el programa de vigilancia entomológica de la CM sí se han identificado hembras alimentadas de varios vertebrados (González y col., 2016b). Este resultado probablemente es debido a la fuerte separación que se ha encontrado en las preferencias alimentarias entre las cuatro estaciones de muestreo, que a su vez se corresponden con la segregación de los conejos y las liebres y su separación por barreras físicas, como ya se ha comentado previamente en esta sección.

En consecuencia, la PCR-RFLP del *cytb* es una técnica eficaz en el análisis de las preferencias alimentarias de los flebotomos y la diferenciación de alimentaciones mixtas en hembras de flebotomos capturadas en diferentes áreas endémicas de leishmaniosis en España. Sin embargo, se estima conveniente evaluar y validar la técnica en las regiones de estudio específicas, con el fin de optimizar su eficacia.

5.4. Determinación de las tasas de infección en *P. perniciosus*

Las tasas de infección por *Leishmania* en flebotomos son un indicador muy útil de la intensidad de transmisión del parásito y de la competencia vectorial de un flebotomo. En el presente estudio, combinamos la detección clásica de promastigotes, mediante la **disección** de hembras de flebotomo, con la detección e identificación del parásito mediante **métodos moleculares**. Aunque la búsqueda bajo el microscopio de promastigotes en el tubo digestivo de los flebotomos es una tarea tediosa que requiere personal altamente cualificado, sin embargo permite el aislamiento del parásito, su cultivo y su preservación para estudios posteriores. Además, permite incriminar a las especies de flebotomos implicadas en la transmisión de la leishmaniosis en un determinado foco mediante la observación de la carga parasitaria y la localización de los promastigotes en sus tubos digestivos (Killick-Kendrick, 1999). Por otro lado, los procedimientos

moleculares presentan una elevada sensibilidad y especificidad. La combinación de ambas metodologías permite el estudio exhaustivo de las tasas de infección y caracterización de los parásitos de *Leishmania*, como han demostrado los estudios realizados en países de la cuenca mediterránea como Italia, Turquía o Israel, entre otros (Rossi y col., 2008; Faiman y col., 2013; Kavur y col., 2015). La **tasa media de infección encontrada mediante disección** en el presente trabajo (3,65%) se encuentra entre los valores más altos reportados en algunos estudios realizados en España, que oscilan entre el 0,27% y el 4,6% (Rioux y col., 1986; Lucientes-Curdi y col., 1988; Morillas-Márquez y col., 1991, 1996; Martín-Sánchez y col., 1992, 2006). Por otro lado, son mayoritariamente superiores a las reportadas en otros países de la región mediterránea en donde se han encontrado porcentajes cercanos o menores al 1%, como en Albania (0,9%) (Velo y col., 2017), Georgia (1,1%) (Giorgobiani y col., 2012), Israel (0,8%) (Svobodova y col., 2006, 2009), Italia (0,47%) (Maroli y col., 1987; Rossi y col., 2008), Portugal (0,35%) (Alves-Pires y col., 2001) o Turquía (0,32%) (Kavur y col., 2015; Sari y col., 2015; Özbel y col., 2016). Excepcionalmente se ha reportado una tasa del 14% en Francia (Rioux y col., 1972). El patrón de las tasas de infección halladas a lo largo de los tres años de estudio ha sido diferente, posiblemente debido a las diferencias observadas en el número de flebotomos capturados. Las mayores tasas de infección se observaron en meses con un número bajo de capturas y al final de la actividad estacional, destacando los elevados valores en BOS (25%) y en POL (33,30%) alcanzados en octubre de 2013. Anteriores estudios entomológicos han reportado también las mayores tasas de infección en los últimos meses del periodo de actividad de los flebotomos (Morillas-Márquez y col., 1991; Killick-Kendrick y Rioux, 2002). Además, estas elevadas tasas de infección encontradas en 2013 sin duda tienen una estrecha relación con el aumento de los casos de leishmaniosis humana registrados a principios de 2014 (ver Figura 32) (Arce y col., 2017).

En cuanto a los aislados obtenidos mediante disección de las hembras de flebotomo capturadas en este trabajo se caracterizaron como **genotipo ITS-Lombardi**. Este mismo genotipo ha sido identificado en los aislados obtenidos en los estudios de xenodiagnóstico directo realizados en liebres y conejos capturados en la zona de brote (Molina y col., 2012; Jiménez y col., 2014), así como en muestras de pacientes de este mismo área (Chicharro y col., 2013), permitiendo la descripción del ciclo silvestre de *L. infantum* en la zona. Esta información es importante para la comprensión de la epidemiología de la enfermedad y conocer si existe más de un genotipo de *Leishmania* implicado en una zona endémica o en un brote, tal y como se ha reportado en otros estudios realizados en Europa (Chicharro y col., 2017b; Rugna y col., 2017)

Con respecto a la detección de *Leishmania* en flebotomos mediante **procedimientos moleculares**, los resultados obtenidos mostraron unas tasas más elevadas que las detectadas mediante la disección de flebotomos, y una mayor sensibilidad y especificidad. Concretamente, los resultados evidenciaron un porcentaje de infección mayor en aquellas hembras con sangre en su tubo digestivo (13,35%), que en aquellas

en las que no se observó sangre (7,78%). Estos resultados contrastan con el estudio preliminar llevado a cabo por Jiménez y col., 2013, en el que la tasa fue superior en hembras sin sangre (60,33%). Esto es probablemente debido al bajo número de flebotomos analizados en ese estudio (121 hembras sin sangre, 8 con sangre visible en el tubo digestivo y 6 hembras grávidas) y a que las hembras de *P. perniciosus* habían sido capturadas entre finales de septiembre y primeros de octubre, coincidiendo con el fin del periodo de actividad, cuando las tasas de infección suelen ser más altas, tal y como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, otros estudios realizados en diferentes países de la cuenca mediterránea como Grecia, Italia o Marruecos, y de otros países como la India, han producido resultados similares a los de este trabajo, reportando tasas de infección más altas en las hembras que presentaban sangre (Aransay y col., 2000; Rossi y col., 2008; Alcover y col., 2012; Tiwary y col., 2013; Es-Sette y col., 2014; Ajaoud y col., 2015). Este resultado estaría también apoyado por estudios recientes en los que se describe que la infección en el tubo digestivo de hembras infectadas sufre un gran incremento tras una nueva ingesta de sangre (Moraes y col., 2018; Serafim y col., 2018). En relación a los resultados obtenidos, es destacable el elevado número de hembras de flebotomos infectadas en el que se había detectado sangre de liebre, principalmente en 2012, que representan un número significativo del total de hembras alimentadas, y que podría ser el responsable de la elevada tasa de infección detectada en este grupo. Esta observación se apoya también en el hallazgo de un mayor número de hembras con sangre positivas a *L. infantum* se encontró en 2012. El hecho de que las tasas de infección fueran descendiendo desde el 2012 al 2014 puede ser consecuencia de las medidas de control tomadas en los parques forestales de Bosquesur y Polvoranca para reducir la población de liebres y conejos (Vilas y col., 2012; Arce y col., 2013; de Pablo y col., 2017; Ordobás y col., 2017). En este sentido, la drástica reducción en el número de liebres en la estación POL se tradujo en una disminución considerable de la tasa de infección de las hembras de *P. perniciosus* capturadas en 2014. Sin embargo, en la estación BOS no se observó tal reducción en la densidad de conejos durante los periodos de muestreo, lo que se correlaciona con las altas tasas de infección encontradas en dicha estación a lo largo de los tres años del estudio.

Existen pocos estudios entomológicos en España en los que se haya llevado a cabo la detección molecular de leishmaniosis en flebotomos. En Granada se han determinado mediante PCR-ELISA tasas de infección del 47,6% en *P. langeroni* (Sáez y col., 2018) y de entre el 5% y el 0,45% en *P. perniciosus* (Martín-Sánchez y col., 2006; Sáez y col., 2018). En Cataluña se han detectado tasas de infección del 76,6% y del 18,9% en *P. perniciosus* y *P. ariasi* capturados en dos regiones de alta endemicidad de leishmaniosis canina como son la región del Priorat y Ainet del Besan, respectivamente (Alcover y col., 2012). En otros estudios llevados a cabo en Extremadura se reporta un porcentaje de flebotomos infectados del 0,33% (Bravo-Barriga y col., 2016); dato similar a los resultados hallados en la región del Algarve en Portugal y otros focos de este país (Branco y col., 2013; Maia y col., 2009, 2013, 2015).

Los resultados obtenidos en este trabajo mediante las diferentes PCRs coinciden con otros estudios en los que también compaginan diferentes dianas con el fin de mejorar la detección de las hembras de flebotomos infectadas y la identificación de la especie de *Leishmania* presente en ellas (Parvizi y col., 2005; Oshaghi y col., 2009; Branco y col., 2013; Maia y col., 2013; Bravo-Barriga y col., 2016a; Hussain y col., 2017).

5.5. Detección y cuantificación de *L. infantum* en *P. perniciosus*

Como se ha señalado anteriormente, se ha hallado una elevada densidad y abundancia relativa de *P. perniciosus* en la zona del estudio, detectándose además de una alta presencia de *L. infantum* mediante disección, unas tasas de infección notables por PCR convencional. La validación del ensayo de qPCR ha permitido llevar a cabo, no sólo la detección de *L. infantum*, sino también la estimación de cargas parasitarias en las hembras de *P. perniciosus* capturadas durante los muestreos en la zona del brote.

Para la optimización de la qPCR descrita se realizaron dos curvas patrón, una en la que solamente se incluía ADN extraído de promastigotes de *L. infantum*, y una segunda en la que se añadía además el ADN extraído de hembras de *P. perniciosus* procedentes de la colonia mantenida en el LEM (CNM-ISCIII). El análisis estadístico mostró que no existían diferencias significativas ($p=0,6294$) entre los resultados obtenidos en ambas curvas, por lo que se concluyó que el ADN del flebotomo no interfiere en la reacción. Este resultado coincide con los experimentos realizados por Ranasinghe y col., 2008, en los que observaron que el ADN de *L. longipalpis* no interfería en los experimentos llevados a cabo para la validación de una qPCR de detección y cuantificación de *Leishmania*, obteniendo valores de sensibilidad y especificidad óptimos.

La qPCR presentó la misma sensibilidad que la PCR-ADNk convencional, fijándose un límite de detección de 0,001 parásitos/reacción, lo que corresponde a 0,08 fg de ADN del parásito (Peacock y col., 2007). Estos valores son similares a los reportados por otros estudios en los que también se han analizado las cargas parasitarias en flebotomos mediante qPCR-ADNk (Myskova y col., 2008; Bezerra-Vasconcelos y col., 2011; Cunha y col., 2014). A pesar de haberse obtenido un límite de detección adecuado, las curvas estándar mostraron menor linealidad en aquellas diluciones inferiores a 1 parásito/ μ l, circunstancia igualmente observada en otros estudios, como el realizado por Abbasi y col., 2013, que al evaluar una qPCR para la detección de *L. donovani* en muestras de sangre recogida en papel de filtro, encuentran también una disminución en la eficacia de las diluciones inferiores de la curva estándar. Sin embargo, las reacciones con muestras de ADN extraído de hembras de flebotomo mostraron una eficiencia cercana al valor óptimo (eficiencia=1, valor medio de las reacciones= $1,06\pm 0,07$).

El 70% de las hembras analizadas en este estudio presentaron un número significativo de parásitos de *Leishmania* en su tubo digestivo (>10 parásitos/reacción), superando el 16,17% de ellas los 10.000 parásitos/reacción y encontrándose incluso un ejemplar con

una carga superior a los 100.000 parásitos/reacción. En Europa no se han detectado cargas parasitarias tan elevadas en hembras de *P. perniciosus* capturadas en el campo hasta el momento. En estudios entomológicos realizados en el sur de Italia, el análisis mediante qPCR de hembras de *P. perniciosus* halló cargas parasitarias máximas de 9.800 parásitos/flebotomo (Latrofa y col., 2018). Por el contrario, en el caso de los estudios realizados por Rodrigues y col., 2016 con ejemplares de *L. longipalpis* capturados en zonas endémicas de Brasil, sí se han registrado cargas parasitarias superiores a las detectadas en este trabajo, que incluso superan los 6.000.000 de parásitos/flebotomo.

La presencia de un elevado número de promastigotes en el tubo digestivo del flebotomo conduce al bloqueo de la VE, obligando a las hembras de flebotomo a permanecer más tiempo tratándose de alimentar del mismo o de otro hospedador, comportamiento que aumenta el riesgo de transmisión del parásito. En este sentido, estudios realizados a través de infecciones experimentales han demostrado que una elevada presencia de parásitos de la especie *L. infantum* y *L. mexicana* promueven que las hembras de flebotomo infectadas se alimenten sobre múltiples hospedadores (Rogers y Bates, 2007). Además, las **cargas parasitarias significativamente más altas** encontradas en el tubo digestivo de **hembras sin sangre** son una prueba consistente de un establecimiento y replicación adecuados de los parásitos en el interior del flebotomo, teniendo así mayores probabilidades de supervivencia y dando lugar a infecciones de etapa tardía en el tubo digestivo medio de los flebotomos (Rogers y Bates, 2007; Myskova y col., 2008). Los resultados corroboran que *P. perniciosus* es un excelente vector de la leishmaniosis en el área del brote ya que la intensidad de la infección por *L. infantum* en las hembras capturadas evidencia la multiplicación del parásito y su potencial transmisión (Killick-Kendrick, 1990b). Otros autores han encontrado también mayores cargas de parásitos en hembras grávidas y en hembras sin presencia de sangre, en comparación con aquellas que sí presentaban sangre en su tubo digestivo (Tiwar y col., 2013). En cuanto a la baja carga parasitaria encontrada en la mayoría de **hembras de flebotomo con sangre** estudiadas, esta podría deberse a la ingesta reciente de sangre de vertebrados infectados. Por otro lado, también se han observado cargas parasitarias elevadas en algunas hembras con sangre fresca, lo que sugiere que podrían estar ya infectadas en el momento de la nueva ingesta de sangre y haber transmitido el parásito al vertebrado del cual se han alimentado. Como se ha explicado en apartados anteriores, las altas cargas parasitarias observadas en hembras con presencia de sangre se deberían al gran efecto amplificador que ejerce una nueva ingesta de sangre posterior a una primera infectante (Moraes y col., 2018; Serafim y col., 2018).

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten afirmar que la estimación de la carga parasitaria en flebotomos mediante qPCR puede ser adecuada para incriminar a potenciales vectores de la leishmaniosis, sin dejar a un lado la disección de hembras, metodología que nos permite localizar y aislar los promastigotes presentes en el tubo digestivo (Myskova y col., 2008).

5.6. Detección de *T. nabiasi* en hembras de *P. perniciosus*

En este trabajo se ha detectado ADN de *T. nabiasi* en 20 hembras de *P. perniciosus* de un total de 155 hembras analizadas mediante la amplificación y posterior secuenciación de la región ITS1 y ARNr SSU. Sin embargo, sólo ha sido posible identificar este tripanosomátido en 8 de estas hembras. Esto se debe a que algunas de las bandas obtenidas tras la electroforesis de los productos amplificados presentaron muy baja intensidad, dificultando la obtención de ADN con la calidad suficiente para su posterior secuenciación. En relación al análisis de las secuencias de la región ITS1 se encontró que el ADN pertenecía al tripanosomátido *T. nabiasi* al presentar las secuencias un grado de similitud superior al 99% con las secuencias anotadas por Merino-Espinosa y col., 2016 correspondientes a los trabajos realizados con muestras de tejidos obtenidas de conejos silvestres capturados en Granada. Así mismo, el análisis de estas secuencias mostró la existencia de diferencias entre las propias secuencias obtenidas en este trabajo y de estas con las secuencias de *T. nabiasi* de Granada, resultados que confirman la existencia de una elevada variabilidad en la región ITS1 de este tripanosomátido e indican la existencia de un mayor número de linajes que el ya descrito en estudios anteriores (Merino-Espinosa y col., 2016).

Aunque la PCR-ITS1 permite la diferenciación entre los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* gracias al diferente tamaño del fragmento amplificado y a la secuenciación posterior (Vanhollebeke y col., 2006; Sarataphan y col., 2007; Verma y col., 2011), se consideró oportuno realizar la confirmación de la identidad del tripanosomátido mediante la amplificación y posterior secuenciación del fragmento de ARNr SSU, tal como han realizado otros autores (Noyes y col., 1999; Hamilton y col., 2005). El análisis de estos fragmentos confirmó la identidad del tripanosomátido al existir un 100% de similitud con las secuencias anotadas en la base de datos Genbank® (Hamilton y col., 2005), resultados que concuerdan a su vez con los obtenidos por Merino-Espinosa y col., 2016. Así mismo, el estudio filogenético de la región ITS1 confirmó la agrupación de las secuencias obtenidas en este estudio con las anotadas por Merino-Espinosa y col., 2016. En el caso de la región ARN SSU, los estudios mostraron que las secuencias de *T. nabiasi* de este trabajo se agrupaban con las anotadas por Hamilton y col., 2005. Así mismo, se observó una relación entre los microorganismos analizados comparable a la obtenida por Hamilton y col., 2005, en la que *T. nabiasi* se agrupa con *T. kuseli*, *Trypanosoma microti* y *T. otospermophili* (subclado 2); mientras que otros tripanosomas (*Trypanosoma grosi*, *Trypanosoma lewisi*, *Trypanosoma musculi* y *Trypanosoma rabinowitschae*) constituyen un grupo aparte (subclado 1). Estos resultados se vieron confirmados mediante los análisis de *bootstrap*.

T. nabiasi parece ser la única especie de tripanosoma que infecta al conejo doméstico y silvestre (Molyneux, 1970; Hoare, 1972; Hamilton y col., 2005), siendo el vector responsable de su transmisión la pulga del conejo, *Spilopsyllus cuniculi*. Dicha transmisión tiene lugar por contacto con los tripanosomas expulsados con las heces en el

lugar de la picadura de la pulga o por ingestión de pulgas y heces de pulgas infectadas (Hoare, 1972; Hamilton y col., 2005;). Este tripanosoma se ha descrito en conejos procedentes de varios países europeos, como Francia, Italia, Portugal y el Reino Unido (Grewal, 1957) y también en Australia (Hamilton y col., 2005). En España solamente se han encontrado conejos infectados con este tripanosomátido en el sur del país, donde se ha descrito también la coinfección *T. nabiasi*/*L. infantum* (Reglero y col., 2007; Díaz-Sáez y col., 2014; Merino-Espinosa y col., 2016). Así pues, el hallazgo de este parásito en hembras de *P. perniciosus* alimentadas de conejo en la zona del brote sugiere que estos leporídeos se encuentran infectados por *T. nabiasi* en esta región, hecho que no se había reportado hasta el momento. También cabría la posibilidad de que *P. perniciosus* pudiera estar implicado en su transmisión. En este sentido, algunas especies de flebotomos parecen actuar como vectores de tripanosomas que afectan a murciélagos (Zeledón y Rosabal, 1969), lagartijas (Ayala y McKay, 1971; Gramiccia y col., 1989), serpientes (Viola y col., 2008) y sapos (Anderson y Ayala, 1968). Concretamente, se ha reportado la presencia de *Trypanosoma avium*, *Trypanosoma fallisi* o *Trypanosoma mega*, o el ADN de los mismos, en diferentes flebotomos del continente americano (Ayala, 1971; De Souza Rocha y col., 2010; Kato y col., 2010, 2011; Saraiva y col., 2010; Ferreira y col., 2015), y de Asia (Phumee y col., 2017). Recientemente se ha encontrado un tripanosoma relacionado con *T. theileri* en *P. perfiliewi* en Italia (Calzolari y col., 2018). Sin embargo, la información disponible sobre la posible transmisión por estos artrópodos es escasa y tan sólo existen algunos estudios realizados con reptiles en Sudamérica (Anderson y Ayala, 1968; Viola y col., 2008). El posible papel de los flebotomos como vectores de estos tripanosomas se ve respaldado por la permisividad que muestran algunas especies, como *P. perniciosus*, para la transmisión de diferentes especies de *Leishmania* (Depaquit y col., 2010; Dostálová y Volf, 2012; Maroli y col., 2013), además de la reciente demostración mediante infecciones experimentales de la susceptibilidad de dos especies de flebotomos (*L. longipalpis* y *Phlebotomus arabicus*) a la infección por *T. avium* (Svobodová y Rádrová, 2018). Sin embargo, la detección molecular del tripanosoma no es condición suficiente para incriminar a *P. perniciosus* como vector, pues podría haberse tratado solamente de la ingesta reciente de sangre de conejos infectados con este parásito. Por ello, el papel de las hembras de *P. perniciosus* como posibles vectores de *T. nabiasi* está aún por dilucidar y será necesario emplazar para futuras investigaciones la confirmación de la presencia de estos tripanosomas en el tubo digestivo de los flebotomos, el aislamiento del tripanosoma del tubo digestivo de flebotomos infectados, así como la realización de infecciones experimentales para estudiar el ciclo intravectorial de este parásito. Sin embargo, el hecho de no haberse detectado indicios del desarrollo de este tripanosoma en *P. perniciosus* tras la disección, aislamiento y caracterización de los aislados obtenidos en el brote de leishmaniosis de la CM parece no jugar a favor de la incriminación de este flebotomo como vector de *T. nabiasi*.

Discusión

Finalmente, estudios sobre la seroprevalencia de *L. infantum* llevados a cabo en conejos y liebres capturados en el área del brote han mostrado valores elevados de exposición de estos animales a este parásito (Moreno y col., 2014). Sin embargo, estos resultados deberían ser valorados con cautela debido a la posible coinfección de ambos tripanosomátidos y a la presencia de antígenos compartidos por organismos filogenéticamente tan cercanos (Díaz-Sáez y col., 2014). En este sentido, Zanette y col., 2014 han demostrado la existencia de reactividad cruzada entre *Leishmania* sp. y *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, los análisis realizados por De la Cruz y col., 2016 muestran la utilidad de la técnica de detección de anticuerpos mediante inmunofluorescencia indirecta (IFAT, *immunofluorescence antibody test*) como método de *screening* para el diagnóstico de leishmaniosis en liebres y conejos.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

I. *Phlebotomus perniciosus* es la especie de flebotomo más abundante y la única responsable de la transmisión de *Leishmania infantum* en el área del brote de leishmaniosis humana del suroeste de la Comunidad de Madrid. Las elevadas densidades de población registradas de este flebotomo en la zona sugieren además un alto riesgo de transmisión.

II. Las dinámicas estacionales observadas muestran un patrón predominantemente bimodal confluyente en el caso de *Phlebotomus perniciosus*, mientras que *Sergentomyia minuta* presenta un modelo monomodal.

III. La temperatura y humedad relativa ambientales influyen en las fluctuaciones de las poblaciones de flebotomos a lo largo de su ciclo nictemeral. Se han observado diferencias en la relación de estos factores sobre las hembras y los machos de *Phlebotomus perniciosus* y *Sergentomyia minuta*.

IV. Las tasas de infección por *Leishmania infantum* detectadas en hembras de *Phlebotomus perniciosus*, tanto por disección como por métodos moleculares, muestran unos valores elevados, confirmando el alto riesgo de transmisión del parásito en la zona. La caracterización molecular de los promastigotes aislados mediante disección confirma la circulación del mismo genotipo de *Leishmania infantum* (genotipo ITS-Lombardi) entre los flebotomos, los conejos, las liebres y los humanos de la zona del brote.

V. La optimización y aplicación de una PCR cuantitativa han puesto de manifiesto unas elevadas cargas de *Leishmania infantum* en las hembras de *Phlebotomus perniciosus* infectadas capturadas en el área del brote, lo que puede favorecer un aumento en la intensidad de transmisión del parásito.

VI. El estudio de las preferencias alimentarias, mediante el análisis de un fragmento conservado del gen del *cytb*, pone de manifiesto el carácter oportunista de *Phlebotomus perniciosus* y corrobora el importante papel que conejos y liebres están jugando en el ciclo silvestre de *Leishmania infantum* instaurado en los dos grandes parques colindantes al área del brote.

Conclusiones

VII. La discriminación de las fuentes de alimentación mediante la PCR-RFLP de *cytb* diseñada y optimizada en este trabajo constituye una herramienta eficaz para la identificación de las fuentes de alimentación en flebotomos, especialmente de alimentaciones mixtas, y es una alternativa frente a técnicas más complejas y caras como la secuenciación.

VIII. Los métodos moleculares han permitido detectar por primera vez la presencia *Trypanosoma nabiasi* en hembras de *Phlebotomus perniciosus* en las que se había identificado sangre de conejo en su tubo digestivo. Este hallazgo sugiere la circulación de este parásito entre los conejos de la zona y la posible implicación de los flebotomos en su transmisión.

IX. Los estudios entomológicos desarrollados en la presente Tesis Doctoral son los más exhaustivos y completos realizados en el brote de leishmaniosis humana más importante acaecido en Europa. La combinación de técnicas biológicas clásicas y métodos moleculares ha demostrado ser una estrategia eficaz en la descripción de las poblaciones de flebotomos presentes y de sus fluctuaciones estacionales, así como de las tasas de infección y las preferencias alimentarias. La información resultante de estos estudios confirmaría la hipótesis de que el brote de leishmaniosis del suroeste de la Comunidad de Madrid se ha debido a un fenómeno de “urbanización” de la leishmaniosis.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard-Hansen, J., Nombela, N., Alvar, J., 2010. Population movement: A key factor in the epidemiology of Neglected Tropical Diseases. *Trop. Med. Int. Heal.* 15, 1281-1288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02629.x>
- Abbasi, I., Aramin, S., Hailu, A., Shiferaw, W., Kassahun, A., Belay, S., Jaffe, C., Warburg, A., 2013. Evaluation of PCR procedures for detecting and quantifying *Leishmania donovani* DNA in large numbers of dried human blood samples from a visceral leishmaniasis focus in Northern Ethiopia. *BMC Infect. Dis.* 13, 1. doi:10.1186/1471-2334-13-153
- Abbasi, I., Cunio, R., Warburg, A., 2009. Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome *b* PCR and reverse line blotting. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 9, 79-86. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0064>
- Adini, I., Jacobson, R.L., Kasap, M., Schlein, Y., Jaffe, C., 1998. Species-specific immunosorbent detection assay of *Leishmania* in sandflies using an enzyme-linked. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 35-37. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(98\)90946-4](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(98)90946-4)
- Adler, S., 1964. *Leishmania*, en: Dawes, B. (Ed.), *Advances in Parasitology*. Academic Press, Londres y Nueva York, pp. 35-96.
- Adler, S., Ber, M., 1941. The transmission of *Leishmania tropica* by the bite of *Phlebotomus papatasi*. *Nature* 148, 227. <https://doi.org/10.1038/148227a0>
- Adler, S., Theodor, O., 1935. Investigations on Mediterranean Kala Azar IX — Feeding experiments with *Phlebotomus perniciosus* and other species on animals infected with *Leishmania infantum*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 116, 516-542. <https://doi.org/10.1098/rspb.1935.0007>
- Adler, S., Theodor, O., 1926. The mouth parts, alimentary tract, and salivary apparatus of the female in *Phlebotomus papatasi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 20, 109-142. <https://doi.org/10.1080/00034983.1926.11684482>
- AEMET, 2018. Valores climatológicos normales: Getafe - Agencia Estatal de Meteorología. <http://www.aemet.es/es/serviciosclimaticos/datosclimatologicos/valoresclimatologicos?l=3200&k=mad>
- Agassiz, L., 1846. *Nomenclatoris Zoologici Index Universalis, continens nomina systematica classium, ordinum, familiarum et generum animalium omnium, tam viventium quam fossilium, secundum ordinem alphabeticum unicum disposita, adjectis homonymis plantarum nec non variis adnotationibus et emendationibus: i-x, 1-1135*. Soloduri. : Sumptibus Jent et Gassman.
- Aghaei, A.A., Rassi, Y., Sharifi, I., Vatandoost, H., Mollaie, H.R., Oshaghi, M.A., Abai, M.R., Rafizadeh, S., 2014. First report on natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus sergenti* due *Leishmania tropica* by high resolution melting curve method in South-eastern Iran. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 7, 93-96. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60002-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60002-X)
- Agrela, I., Sánchez, E., Gómez, B., Feliciangeli, M.D., 2002. Feeding behavior of *Lutzomyia pseudolongipalpis* (Diptera: Psychodidae), a putative vector of visceral leishmaniasis in Venezuela. *J. Med. Entomol.* 39, 440-5. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.3.440>
- Aguado, M., Espinosa, P., Romero-Maté, A., Tardío, J.C., Córdoba, S., Borbujo, J., 2013. Brote de leishmaniasis cutánea en el municipio de Fuenlabrada. *Actas Dermosifiliogr.* 104, 334-342. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2012.11.005>

Bibliografia

- Ajaoud, M., Es-Sette, N., Charrel, R.N., Laamrani Idrissi, A., Nhammi, H., Riyad, M., Lemrani, M., 2015. *Phlebotomus sergenti* in a cutaneous leishmaniasis focus in Azilal Province (High Atlas, Morocco): Molecular detection and genotyping of *Leishmania tropica*, and feeding behavior. PLoS Negl. Trop. Dis. 9, 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003687>
- Ajaoud, M., Es-Sette, N., Hamdi, S., El-Idrissi, A.L., Riyad, M., Lemrani, M., 2013. Detection and molecular typing of *Leishmania tropica* from *Phlebotomus sergenti* and lesions of cutaneous leishmaniasis in an emerging focus of Morocco. Parasit. Vectors 6, 1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-217>
- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., Sereno, D., 2017. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. Mol. Aspects Med. 57, 1-29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D., 2016. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, 1-40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Al-Soud, W.A., Rådström, P., 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. J. Clin. Microbiol. 39, 485-493. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.485>
- Alam, M.Z., Haralambous, C., Kuhls, K., Gouzelou, E., Sgouras, D., Soteriadou, K., Schnur, L., Pratlong, F., Schönian, G., 2009. The paraphyletic composition of *Leishmania donovani* zymodeme MON-37 revealed by multilocus microsatellite typing. Microbes Infect. 11, 707-715. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.009>
- Alawieh, A., Musharrafieh, U., Jaber, A., Berry, A., Ghosn, N., Bizri, A.R., 2014. Revisiting leishmaniasis in the time of war: The Syrian conflict and the Lebanese outbreak. Int. J. Infect. Dis. 29, 115-119. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.04.023>
- Alcover, M.M., Ballart, C., Martín Sánchez, J., Serra, T., Castillejo, S., Portús, M., Gállego, M., 2014. Factors influencing the presence of sand flies in Majorca (Balearic Islands, Spain) with special reference to *Phlebotomus perniciosus*, vector of *Leishmania infantum*. Parasit. Vectors 7, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-421>
- Alcover, M.M., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ballart, C., Castillejo, S., Picado, A., Portús, M., Gállego, M., 2012. Application of molecular techniques in the study of natural infection of *Leishmania infantum* vectors and utility of sandfly blood meal digestion for epidemiological surveys of leishmaniasis. Parasitol. Res. 111, 515-523. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2863-4>
- Alexander, B., 2000. Sampling methods for phlebotomine sandflies. Med. Vet. Entomol. 14, 109-122. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00237.x>
- Alexander, B., Maroli, M., 2003. Control of phlebotomine sandflies. Med. Vet. Entomol. 17, 1-18. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00420.x>
- Alexander, B., Usma, M.C., Cadena, H., Quesada, B.L., Solarte, Y., Roa, W., Travi, B.L., 1995. Evaluation of deltamethrin-impregnated bednets and curtains against phlebotomine sandflies in Valle del Cauca, Colombia. Med. Vet. Entomol. 9, 279-283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1995.tb00134.x>
- Alirol, E., Getaz, L., Stoll, B., Chappuis, F., Loutan, L., 2011. Urbanisation and infectious diseases in a globalised world. Lancet Infect. Dis. 11, 131-141. <https://doi.org/10.1016/S1473->

3099(10)70223-1

- Alten, B., Ozbel, Y., Ergunay, K., Kasap, O.E., Cull, B., Antoniou, M., Velo, E., Prudhomme, J., Molina, R., Banuls, A.L., Schaffner, F., Hendrickx, G., Van Bortel, W., Medlock, J.M., 2015. Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Europe. *Bull. Entomol. Res.* 105, 664-678. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000127>
- Alten, B., Maia, C., Afonso, M.O., Campino, L., Jiménez, M., González, E., Molina, R., Bañuls, A.L., Prudhomme, J., Vergnes, B., Toty, C., Cassan, C., Rahola, N., Thierry, M., Sereno, D., Bongiorno, G., Bianchi, R., Khoury, C., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M., Christodoulou, V., Mazeris, A., Karakus, M., Ozbel, Y., Arserim, S.K., Erisoz Kasap, O., Gunay, F., Oguz, G., Kaynas, S., Tsertsvadze, N., Tskhvaradze, L., Giorgobiani, E., Gramiccia, M., Volf, P., Gradoni, L., 2016. Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004458>
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 57, 1-88. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X)
- Alvar, J., Cañavate, C., Gutiérrez Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., López Vélez, R., Molina, R., Moreno, J., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., López-Vélez, R., Molina, R., Moreno, J., 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 298-319.
- Alvar, J., Jiménez, M., 1994. Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs. *AIDS Rev.* 8, 854.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., de Boer, M., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7, 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Alvar, J., Yactayo, S., Bern, C., 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 22, 552-557. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>
- Alves, P.C., Ferrand, N., Suchentrunk, F., Harris, D.J., 2003. Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27, 70-80. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00417-7](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00417-7)
- Alves-Pires, C., Campino, L., Afonso, M., Santos Gomes, G., Dedet, J.-P., Pratlong, F., 2001. The phlebotomines of Portugal. X-Natural infestation of *Phlebotomus perniciosus* by *Leishmania infantum*. *Parasite* 8, 374-375.
- Amela, C., Suárez, B., Isidoro, B., Sierra, M.J., Santos, S., Simón, F., 2012. Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social.
- Amusatogui, I., Sainz, A., Aguirre, E., Tesouro, M.A., 2004. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026, 154-157. <https://doi.org/10.1196/annals.1307.022>
- Anders, G., Eisenberg, C.L., Jonas, F., Greenblatt, L., 2002. Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 87-92.
- Anderson, J., Ayala, S., 1968. Trypanosome transmitted by *Phlebotomus*: First report from the Americas. *Science* (80). 161, 1023-1025. <https://doi.org/10.1126/science.161.3845.1023>

Bibliografía

- Anderson, N.E., Mubanga, J., Machila, N., Atkinson, P.M., Dzingirai, V., Welburn, S.C., 2015. Sleeping sickness and its relationship with development and biodiversity conservation in the Luangwa Valley, Zambia. *Parasit. Vectors* 8, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0827-0>
- Angelini, R., Finarelli, A.C., Angelini, P., Po, C., Petropulacos, K., Macini, P., Fiorentini, C., Fortuna, C., Venturi, G., Romi, R., Majori, G., Nicoletti, L., Rezza, G., Cassone, A., 2007. An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Wkly. releases* 12, 3260. <https://doi.org/10.2807/esw.12.36.03260-en>
- Anthony, R.L., Williams, K.M., Sacci, J.B., Rubin, D.C., 1985. Subcellular and taxonomic specificity of monoclonal antibodies to New World *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 1085-1094. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1985.34.1085>
- Antinori, S., Cascio, A., Parravicini, C., Bianchi, R., Corbellino, M., 2008. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect. Dis.* 8, 191-199. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70043-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70043-4)
- Aránguez, E., Arce, A., Moratilla, L., Estirado, A., Iriso, A., Ureña, S.D. la F., Soto Zabalgoeazcoa, M.J., Fuster, F., Ordobás, M., Serrano, A.M.M., Herranz, F.V., 2014. Análisis espacial de un brote de leishmaniasis en el sur del Área metropolitana de la Comunidad de Madrid . 2009-2013. *Rev. salud Ambient.* 14, 39-53.
- Aránguez, E., Iriso, A., 2017. Análisis espacial y condicionantes territoriales del brote de leishmaniasis en el sur del área metropolitana de la Comunidad de Madrid (2009-2014). En: Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. Papel de las liebres y los conejos como reservorios. Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, España. ISBN: 978-84-541-3625-6, pp. 245-265.
- Aransay, A.M., Ready, P.D., Morillas-Márquez, F., 2003. Population differentiation of *Phlebotomus perniciosus* in Spain following postglacial dispersal. *Heredity (Edinb.)*. 90, 316-325. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800246>
- Aransay, A.M., Scoulica, E., Tselentis, Y., 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1933-1938. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1933-1938.2000>
- Aransay, A.M., Testa, J.M., Morillas-Márquez, F., Lucientes, J., Ready, P.D., 2004. Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitol. Res.* 94, 416-420. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1231-4>
- Arce, A., Estirado, A., Ordobás, M., Moratilla, L., García, N., Pérez, M.A., Gil, E., Aránguez, E., García Puente, E., Martínez, A.M., 2017. Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid: detección e investigación epidemiológica. En: Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. Papel de las liebres y los conejos como reservorios. Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, España. ISBN: 978-84-541-3625-6, pp. 105-112.
- Arce, A., Estirado, A., Ordobás, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martínez, A.M., Pérez, A.M., Aránguez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J., Vilas, F., 2013. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: Community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Eurosurveillance* 18, 1-9. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20546>
- Annot, D.E., Barker, D.C., 1981. Biochemical identification of cutaneous leishmanias by analysis of kinetoplast DNA. II. Sequence homologies in *Leishmania* kDNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3,

- 47-56. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(81\)90076-1](https://doi.org/10.1016/0166-6851(81)90076-1)
- Asato, Y., Oshiro, M., Myint, C.K., Yamamoto, Y. ichi, Kato, H., Marco, J.D., Mimori, T., Gomez, E.A.L., Hashiguchi, Y., Uezato, H., 2009. Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome *b* gene sequencing. *Exp. Parasitol.* 121, 352-361. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.12.013>
- Ashford, R.W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269-1281. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00136-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00136-3)
- Ashford, R.W., 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 14, 523-532. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00041-7](https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00041-7)
- Ashford, R.W., Kohestany, K.A., Karimzad, M.A., 1992. Cutaneous leishmaniasis in Kabul: Observations on a «prolonged epidemic». *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86, 361-371. <https://doi.org/10.1080/00034983.1992.11812679>
- Aspöck, H., Gerersdorfer, T., Formayer, H., Walochnik, J., 2008. Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. *Wien. Klin. Wochenschr.* 120, 24-29. <https://doi.org/10.1007/s00508-008-1072-8>
- Ayala, S., 1971. Trypanosomes in wild California sandflies, and extrinsic stages of *Trypanosoma bufophlebotomi*. *J. Protozool.* 18, 433-436. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1971.tb03349.x>
- Ayala, S.C., McKay, J.G., 1971. *Trypanosoma gerrhonoti* n. sp., and extrinsic development of lizard trypanosomes in California sandflies. *J. Protozool.* 18, 430-433. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1971.tb03348.x>
- Ayari, C., Ben Othman, S., Chemkhi, J., Tabbabi, A., Fisa, R., Ben Salah, A., BenAbderrazak, S., 2016. First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia* (Sintonius) *clydei* (Sinton, 1928, Psychodidae: Phlebotominae), from an outbreak area of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Infect. Genet. Evol.* 39, 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.030>
- Ayhan, N., Velo, E., de Lamballerie, X., Kota, M., Kadriaj, P., Özbel, Y., Charrel, R.N., Bino, S., 2016. Detection of *Leishmania infantum* and a novel phlebovirus (Balkan Virus) from sand flies in Albania. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 16, 802-806. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2002>
- Ayllón, T., Tesouro, M.A., Amusategui, I., Villaescusa, A., Rodríguez-Franco, F., Sainz, Á., 2008. Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from central Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 361-364. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.019>
- Ayuntamiento de Fuenlabrada. <http://www.ayto-fuenlabrada.es/index.do?MP=3&MS=31&MN=2&TR=C&IDR=84>
- Azizi, K., Askari, M.B., Kalantari, M., Moemenbellah-Fard, M.D., 2016. Molecular detection of *Leishmania* parasites and host blood meal identification in wild sand flies from a new endemic rural region, south of Iran. *Pathog. Glob. Health* 110, 303-309. <https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1253530>
- Ballart, C., Guerrero, I., Castells, X., Castillejo, S., Alcover, M.M., 2014. Importance of individual analysis of environmental and climatic factors affecting the density of. *Geospat. Health* 8, 389-403. <https://doi.org/10.4081/gh.2014.28>
- Bamorovat, M., Sharifi, I., Dabiri, S., Mohammadi, M.A., Harandi, M.F., Mohebbali, M., Aflatoonian,

Bibliografía

- M.R., Keyhani, A., 2015. *Leishmania tropica* in stray dogs in southeast Iran. Iran. J. Public Health 44, 1359-1366.
- Baneth, G., Zivotofsky, D., Nachum-Biala, Y., Yasur-Landau, D., Botero, A.M., 2014. Mucocutaneous *Leishmania tropica* infection in a dog from a human cutaneous leishmaniasis focus. Parasit. Vectors 7, 1-5. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-118>
- Bañuls, A.L., Hide, M., Prugnolle, F., 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Adv. Parasitol. 64. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)
- Bardosh, K.L., Ryan, S., Ebi, K., Welburn, S., Singer, B., 2017. Addressing vulnerability, building resilience: Community-based adaptation to vector-borne diseases in the context of global change. Infect. Dis. Poverty 6, 1-21. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0375-2>
- Barhoumi, W., Fares, W., Cherni, S., Derbali, M., Dachraoui, K., Chelbi, I., Ramalho-Ortigao, M., Beier, J.C., Zhioua, E., 2016. Changes of sand fly populations and *Leishmania infantum* infection rates in an irrigated village located in arid central Tunisia. Int. J. Environ. Res. Public Health 13, 1-10. <https://doi.org/10.3390/ijerph13030329>
- Barhoumi, W., Qualls, W.A., Archer, R.S., Fuller, D.O., Chelbi, I., Cherni, S., Derbali, M., Arheart, K.L., Zhioua, E., Beier, J.C., 2015. Irrigation in the arid regions of Tunisia impacts the abundance and apparent density of sand fly vectors of *Leishmania infantum*. Acta Trop. 141, 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.10.008>
- Barker, D.C., Gibson, L.J., Kennedy, W.P.K., Nasser, A.A.A.A., Williams, R.H., 1986. The potential of using recombinant DNA species-specific probes for the identification of tropical *Leishmania*. Parasitology 92, S139-S174. <https://doi.org/10.1017/S0031182000085747>
- Barón, S.D., 2014. Estudio cuali-cuantitativo y molecular de los principales vectores de *L. infantum* y *L. tropica* en España (Tesis doctoral). Universidad de Granada
- Barón, S.D., Morillas-Márquez, F., Morales-Yuste, M., Díaz-Sáez, V., Irigaray, C., Martín-Sánchez, J., 2011. Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease. Parasitology 138, 1234-1244. <https://doi.org/10.1017/S0031182011000953>
- Bates, P.A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int. J. Parasitol. 37, 1097-1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Bates, P.A., Rogers, M., 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Curr. Mol. Med. 4, 601-609. <https://doi.org/10.2174/1566524043360285>
- Bates, P.A., Tetley, L., 1993. *Leishmania mexicana*- Induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. Exp. Parasitol. 76, 412-423. <https://doi.org/10.1006/expr.1993.1050>
- Baum, M., de Castro, E.A., Pinto, M.C., Goulart, T.M., Baura, W., Klisiowicz, D. do R., Vieira da Costa-Ribeiro, M.C., 2015. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. Acta Trop. 143, 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.11.006>
- BECM, 2012. Boletín epidemiológico de la Comunidad de Madrid 17.
- Benabdennbi, I., Pesson, B., Cadi-Soussi, M., Marquez, F.M., 1999. Morphological and

- isoenzymatic differentiation of sympatric populations of *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera: Psychodidae) in northern Morocco. J. Med. Entomol. 36, 116-120. <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.1.116>
- Benabid, M., Ghrab, J., Rhim, A., Ben-Romdhane, R., Aoun, K., Bouratbine, A., 2017. Temporal dynamics and *Leishmania infantum* infection prevalence of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Phlebotominae) in highly endemic areas of visceral leishmaniasis in Tunisia. PLoS One 12, 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184700>
- Benallal, K.E., Benikhlef, R., Garni, R., Gassen, B., Dedet, J.P., Harrat, Z., 2017. Presence of *Phlebotomus perniciosus* atypical form in Algeria. J. Arthropod. Borne. Dis. 11, 139-146.
- Benito de Martín, M.I., Gracia Salinas, M.J., Molina Moreno, R., Ferrer Dufol, M., Lucientes-Curdi, J., 1994. Influence of the nature of the ingested blood on the gonotrophic parameters of *Phlebotomus perniciosus*. Parasite 1, 409-411. <https://doi.org/10.1051/parasite/1994014409>
- Bennai, K., Tahir, D., Lafri, I., Bendjaballah-Laliam, A., Bitam, I., Parola, P., 2018. Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA and host blood meal identification in *Phlebotomus* in a hypoendemic focus of human leishmaniasis in northern Algeria. PLoS Negl. Trop. Dis. 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006513>
- Berdjane-Brouk, Z., Koné, A.K., Djimdé, A.A., Charrel, R.N., Ravel, C., Delaunay, P., del Giudice, P., Diarra, A.Z., Doumbo, S., Goita, S., Thera, M.A., Depaquit, J., Marty, P., Doumbo, O.K., Izri, A., 2012. First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia* (Spelaemyia) *darlingi* from cutaneous leishmaniasis foci in Mali. PLoS One 7, 1-5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028266>
- Bernal, J., 2017. Programa de vigilancia e intervención de leishmaniosis. En: Brote de leishmaniosis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. Papel de las liebres y los conejos como reservorios. Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, Spain. ISBN: 978-84-541-3625-6, pp. 267-282.
- Beyrer, C., Villar, J.C., Suwanvanichkij, V., Singh, S., Baral, S.D., Mills, E.J., 2007. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. Lancet 370, 619-627. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61301-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61301-4)
- Bezerra-Vasconcelos, D.R., Melo, L.M., Albuquerque, É.S., Luciano, M.C.S., Bevilacqua, C.M.L., 2011. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: Screening of target genes and assessment of quantitative methods. Exp. Parasitol. 129, 234-239. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.08.010>
- Boakye, D.A., Tang, J., Truc, P., Merriweather, A., Unnasch, T.R., 1999. Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome *b* heteroduplex analysis. Med. Vet. Entomol. 13, 282-287. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1999.00193.x>
- Boité, M.C., Mauricio, I.L., Miles, M.A., Cupolillo, E., 2012. New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania* (Viannia) parasites based on multilocus sequence analysis. PLoS Negl. Trop. Dis. 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001888>
- Bonanni, P., 1691. Observationes circa viventia , quae in rebus non viventibus reperiuntur. Cum micrographia curiosa. Typis Dominici Antonij Herculi, Roma.
- Bongiorno, G., Habluetzel, A., Khoury, C., Maroli, M., 2003. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. Acta Trop. 88, 109-116. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00190-6](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00190-6)

Bibliografía

- Botet Fregola, J. 1991. Los flebotomos (Insecta, Diptera) de Barcelona en tanto que vectores de *Leishmania* Ross, 1903. Contribución a su conocimiento (Tesis Doctoral). Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona.
- Bounamous, A., Boudabous, R., Jouet, D., Augot, D., Ferté, H., Babba, H., Berchi, S., Depaquit, J., 2008. Caractérisation moléculaire et morphologique de deux espèces affines de *Paraphlebotomus*: *Phlebotomus chabaudi* Croset, Abonnenc & Rioux, 1970 et *P. riouxi* Depaquit, Killick-Kendrick & Léger, 1998 (Diptera: Psychodidae). *Parasite* 15, 565-571. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008154565>
- Boussaa, S., Guernaoui, S., Pesson, B., Boumezzough, A., 2005. Seasonal fluctuations of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco. *Acta Trop.* 95, 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.05.002>
- Boussaa, S., Pesson, B., Boumezzough, A., 2007. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of Marrakech city, Morocco. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 101, 715-724. <https://doi.org/10.1179/136485907X241398>
- Branco, M., Ferrand, N., Monnerot, M., 2000. Phylogeography of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome *b* gene. *Heredity* (Edinb). 85, 307-317. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.00756.x>
- Branco, S., Alves-Pires, C., Maia, C., Cortes, S., Cristovão, J.M.S., Gonçalves, L., Campino, L., Afonso, M.O., 2013. Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. *Acta Trop.* 125, 339-348. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.12.008>
- Bravo-Barriga, D., Parreira, R., Maia, C., Afonso, M.O., Blanco-Ciudad, J., Serrano, F.J., Pérez-Martín, J.E., Gómez-Gordo, L., Campino, L., Reina, D., Frontera, E., 2016a. Detection of *Leishmania* DNA and blood meal sources in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in western of Spain: Update on distribution and risk factors associated. *Acta Trop.* 164, 414-424. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.10.003>
- Bravo-Barriga, D., Parreira, R., Maia, C., Blanco-Ciudad, J., Afonso, M.O., Frontera, E., Campino, L., Pérez-Martín, J.E., Serrano Aguilera, F.J., Reina, D., 2016b. First molecular detection of *Leishmania tarentolae*-like DNA in *Sergentomyia minuta* in Spain. *Parasitol. Res.* 115, 1339-1344. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4887-z>
- Brianti, E., Falsone, L., Napoli, E., Gaglio, G., Giannetto, S., Pennisi, M.G., Priolo, V., Latrofa, M.S., Tarallo, V.D., Solari-Basano, F., Nazzari, R., Deuster, K., Pollmeier, M., Gulotta, L., Colella, V., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Otranto, D., 2017. Prevention of feline leishmaniosis with an imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar. *Parasit. Vectors* 10, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2258-6>
- Brooker, S., Mohammed, N., Adil, K., Agha, S., Reithinger, R., Rowland, M., Ali, I., Kolaczinski, J., 2004. Leishmaniasis in refugee and local Pakistani populations. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1681-1684. doi:10.3201/eid1009.040179
- Bruce Alexandre, 2018. <https://roddillon.com/dillons-sand-fly-research/>
- Butcher, B.A., Turco, S.J., Hilty, B.A., Pimenta, P.F., Panunzio, M., Sacks, D.L., 1996. Deficiency in b1,3-Galactosyltransferase of a *Leishmania major* lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sand Fly interaction. *J. Biol. Chem.* 271, 20573-20579. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20573>

- Cable, J., Barber, I., Boag, B., Ellison, A.R., Morgan, E.R., Murray, K., Pascoe, E.L., Sait, S.M., Wilson, A.J., Booth, M., 2017. Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160088. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0088>
- Caldart, E.T., Freire, R.L., Ferreira, F.P., Ruffolo, B.B., Sbeghen, M.R., Mareze, M., Garcia, J.L., Mitsuka-Breganó, R., Navarro, I.T., 2017. *Leishmania* em roedores sinantrópicos (*Rattus rattus*): Uma nova evidência da urbanização de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 26, 17-27. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017001>
- Calzolari, M., Rugna, G., Clementi, E., Carra, E., Pinna, M., Bergamini, F., Fabbi, M., Dottori, M., Sacchi, L., Votýpka, J., 2018. Isolation of a Trypanosome Related to *Trypanosoma theileri* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) from *Phlebotomus perfiliewi* (Diptera: Psychodidae). *Biomed Res. Int.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2597074>
- Cameron, M.M., Milligan, P.J.M., Llanos-Cuentas, A., Davies, C.R., 1995. An association between phlebotomine sandflies and aphids in the Peruvian Andes. *Med. Vet. Entomol.* 9, 127-132. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1995.tb00168.x>
- Campino, L., Cortes, S., Dionísio, L., Neto, L., Afonso, M.O., Maia, C., 2013. The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 516-518. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108042013020>
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J.M., Afonso, M.O., Dedet, J.P., 2006. Leishmaniasis in Portugal: Enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop. Med. Int. Heal.* 11, 1708-1714. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01728.x>
- Can, H., Döşkaya, M., Özdemir, H.G., Şahar, E.A., Karakavuk, M., Pektaş, B., Karakuş, M., Töz, S., Caner, A., Döşkaya, A.D., İz, S.G., Özbek, Y., Gürüz, Y., 2016. Seroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of İzmir, Turkey. *Exp. Parasitol.* 167, 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.05.011>
- Cao, D.P., Guo, X.G., Chen, D.L., Chen, J.P., 2011. Species delimitation and phylogenetic relationships of Chinese *Leishmania* isolates reexamined using kinetoplast cytochrome oxidase II gene sequences. *Parasitol. Res.* 109, 163-173. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2239-6>
- Cardoso, L., Gilad, M., Cortes, H.C.E., Nachum-Biala, Y., Lopes, A.P., Vila-Viçosa, M.J., Simoes, M., Rodrigues, P.A., Baneth, G., 2015. First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. *Parasit. Vectors* 8, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0756-y>
- Cardoso, L., Lopes, A.P., Sherry, K., Schallig, H., Solano-Gallego, L., 2010. Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Vet. Parasitol.* 174, 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.022>
- Carreira, J.C.A., Silva, A.V.M. da, Pita-Pereira, D. de, Brazil, R.P., 2012. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasit. Vectors* 5, 2-6. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-111>
- Casanova, C., Andrichetti, M.T.M., Sampaio, S.M.P., Marcoris, M.L.G., Colla-Jacques, F.E., Prado, Â.P., 2013. Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in Southeastern Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, 21-23.

Bibliografia

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002443>

- Casaril, A.E., de Oliveira, L.P., Alonso, D.P., de Oliveira, E.F., Gomes-Barrios, S.P., de Oliveira Moura Infran, J., Fernandes, W. de S., Oshiro, E.T., Ferreira, A.M.T., Ribolla, P.E.M., de Oliveira, A.G., 2017. Standardization of DNA extraction from sand flies: Application to genotyping by next generation sequencing. *Exp. Parasitol.* 177, 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.010>
- Cassagne, C., Pratlong, F., Jeddi, F., Benikhlef, R., Aoun, K., Normand, A.C., Faraut, F., Bastien, P., Piarroux, R., 2014. Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 551-557. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12387>
- Castilho, T.M., Marcelo, L., Camargo, A., McMahon-pratt, D., Shaw, J.J., Floeter-winter, L.M., 2008. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Trop. Med.* 78, 122-132.
- Castilho, T.M., Shaw, J.J., Lucile, M., Floeter-Winter, L.M., 2003. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J. Clin. Microbiol.* 41, 540-546. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.540>
- CDC, 2004a. Two cases of visceral leishmaniasis in U.S. Military personnel --- Afghanistan, 2002--2004. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5312a5.htm>
- CDC, 2004b. Update: Cutaneous leishmaniasis in U.S. Military personnel --- Southwest/Central Asia, 2002--2004. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5312a4.htm>
- CDC, 1992. Viscerotropic leishmaniasis in persons returning from Operation Desert Storm -- 1990 - 1991. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00016144.htm>
- Ceccarelli, M., Galluzzi, L., Diotallevi, A., Andreoni, F., Fowler, H., Petersen, C., Vitale, F., Magnani, M., 2017. The use of kDNA minicircle subclass relative abundance to differentiate between *Leishmania* (L.) *infantum* and *Leishmania* (L.) *amazonensis*. *Parasit. Vectors* 10, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2181-x>
- Ceccarelli, M., Galluzzi, L., Migliazzo, A., Magnani, M., 2014. Detection and characterization of *Leishmania* (Leishmania) and *Leishmania* (Viannia) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088845>
- Chance, M., Peters, W., Shchory, L., 1974. Biochemical taxonomy of *Leishmania* I: Observations on DNA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68, 74-75. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(74\)90261-2](https://doi.org/10.1016/0035-9203(74)90261-2)
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J., Boelaert, M., 2007. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 873-882. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>
- Chaskopoulou, A., Giantsis, I.A., Demir, S., Bon, M.C., 2016. Species composition, activity patterns and blood meal analysis of sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the metropolitan region of Thessaloniki, an endemic focus of canine leishmaniasis. *Acta Trop.* 158, 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.03.006>
- Chatzis, M.K., Andreadou, M., Leontides, L., Kasabalas, D., Mylonakis, M., Koutinas, A.F., Rallis, T., Ikonomopoulos, J., Saridomichelakis, M.N., 2014. Cytological and molecular detection of

- Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. Vet. Parasitol. 202, 217-225. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.044>
- Chaves, L.F., Cohen, J.M., Pascual, M., Wilson, M.L., 2008. Social exclusion modifies climate and deforestation impacts on a vector-borne disease. PLoS Negl. Trop. Dis. 2, 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000176>
- Chemkhi, J., Souguir, H., Ali, I.B.H., Driss, M., Guizani, I., Guerbouj, S., 2015. Natural infection of Algerian hedgehog, *Atelerix algirus* (Lereboullet 1842) with *Leishmania* parasites in Tunisia. Acta Trop. 150, 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.009>
- Chicharro, C., Fuster, F., Marino, E., Migueláñez, S., Martín, C., Ortega, S., García, E., Llanes, P., Flores, M., Moreno, J., Nieto, J., 2017b. Reservoirs of leishmaniasis in the south-west of Madrid Autonomous Community, Spain. Overlapping of biological cycles. En: 6º World Congress on Leishmaniasis, WorldLeish6, Toledo, España, 16-20 mayo, 2017.
- Chicharro, C., Llanes-Acevedo, P., García, E., Nieto, J., Moreno, J., Cruz, I., 2013. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. Eurosurveillance 18, 1-13. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20545>
- Chicharro, C., Migueláñez, S., Flores, M., García, E., Ortega, S., Fuster, F., Bernal, J., Cruz, I., Nieto, J., 2017. Infección por *Leishmania infantum* en fauna silvestre en el brote de leishmaniasis del área 9 de la Comunidad de Madrid (2011-2014). En: Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. Papel de las liebres y los conejos como reservorios. Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, España. ISBN: 978-84-541-3625-6, pp. 203-211.
- Chicharro, C., Morales, M.A., Serra, T., Ares, M., Salas, A., Alvar, J., 2002. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: A comparison of phenotypic and genotypic tools. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 96, S1-93-S1/99. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90058-1](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90058-1)
- Chusri, S., Thammapalo, S., Silpapojakul, K., Siriyasatien, P., 2014. Animal reservoirs and potential vectors of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 45, 13-19.
- Claborn, D.M., 2010. The biology and control of leishmaniasis vectors. J. Glob. Infect. Dis. 2, 127-34. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62866>
- Cohen, C., Corazza, F., De Mol, P., Brasseur, D., 1991. Leishmaniasis acquired in Belgium. Lancet 338, 128. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)90129-D](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)90129-D)
- Cohnstaedt, L.E.E., Gillen, J.I., Munstermann, L.E., 2008. Light-emitting diode technology improves insect trapping. J. Am. Mosq. Control Assoc. 24, 331-334. <https://doi.org/10.2987/5619.1>
- Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid, Ayuntamiento de Fuenlabrada, Ayuntamiento de Leganés, Ayuntamiento de Getafe, Ayuntamiento de Humanes de Madrid, 2018. La leishmaniasis, cómo protegerla. (<https://www.colvema.org/pdf/folleto/Folleto-Leishmaniosis-2012.pdf>)
- Coleman, R.E., Hochberg, L.P., Swanson, K.I., Lee, J.S., Mcavin, J.C., Moulton, J.K., Eddington, D.O., Groebner, J.L., O'guinn, M.L., Putnam, J.L., 2009. Impact of phlebotomine sand flies on U.S. military operations at Tallil Air Base, Iraq: 4. Detection and identification of *Leishmania* parasites in sand flies. J. Med. Entomol. 46, 649-663. <https://doi.org/10.1603/033.046.0333>
- Colmenares, M. de, Portús, M., Botet, J., Dobaño, C., Gállego, M., Wolff, M., Seguí, G., 1995.

Bibliografía

- Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *Entomol. Soc. Am.* 32, 229-233. <https://doi.org/10.1093/jmedent/32.3.229>
- Colwell, D.D., Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2011. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. *Vet. Parasitol.* 182, 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.012>
- Conesa-Gallego, E., Romera Lozano, E., Martínez-Ortega, E., 1999. Estudio de las poblaciones de flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la Comunidad de Madrid (España). *An. Biol.* 22, 43-50.
- Consejería de Medio Ambiente Administración Local y Ordenación del Territorio, 2018. Información Práctica - Parques Forestales Periurbanos - Parque Forestal Bosquesur. http://www.madrid.org/cs/Satellite?c=CM_InfPractica_FA&cid=1354317838354&language=es&pagename=ComunidadMadrid%2FEstructura&pv=1354317851587
- Consejería de Medio Ambiente Administración Local y Ordenación del Territorio, 2018. Información Práctica - Parques Forestales Periurbanos - Parque Forestal Bosquesur. <http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadertype=Content-Disposition&blobheadervalue1=filename%3DBosquesur.pdf&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1352854944878&ssbinary=true>
- Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, 2007. Atlas. El medio ambiente en la Comunidad de Madrid. Madrid.
- Cotteaux-Lautard, C., Leparç-Goffart, I., Berenger, J.M., Plumet, S., Pages, F., 2016. Phenology and host preferences *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Phlebotominae) in a focus of Toscana virus (TOSV) in South of France. *Acta Trop.* 153, 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.020>
- Courtenay, O., Quinnell, R.J., Garcez, L.M., Shaw, J.J., Dye, C., 2002. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J. Infect. Dis.* 186, 1314-20. <https://doi.org/10.1086/344312>
- Criado-Fornelio, A., Gutiérrez-García, L., Rodríguez-Caabeiro, F., Reus-García, E., Roldan-Soriano, M.A., Díaz-Sánchez, M.A., 2000. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet. Parasitol.* 92, 245-251. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00329-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00329-0)
- Cruz, I., Cañavate, C., Rubio, J.M., Morales, M.A., Chicharro, C., Laguna, F., Jiménez-Mejías, M., Sirera, G., Videla, S., Alvar, J., 2002b. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 Suppl 1, S185-9. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90074-X](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90074-X)
- Cruz, I., Morales, M.A., Noguer, I., Rodríguez, A., Alvar, J., 2002a. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 359, 1124-1125. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08160-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08160-6)
- Cunha, R.C., Andreotti, R., Cominetti, M.C., Silva, E.A., Cunha, R.C., Andreotti, R., Cominetti, M.C., Silva, E.A., 2014. Detection of *Leishmania infantum* in *Lutzomyia longipalpis* captured in Campo Grande, MS. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 23, 269-273. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014049>

- Cupolillo, E., Grimaldi, G., Momen, H., 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 296-311. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.296>
- Cupolillo, E., Medina Acosta, E., Noyes, H., Momen, H., Grimaldi, G., 2000. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol. Today* 16, 142-144. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01609-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01609-9)
- Cupp, E.W., Zhang, D., Yue, X., Cupp, M.S., Guyer, C., Sprenger, T.R., Unnasch, T.R., 2004. Identification of reptilian and amphibian blood meals from mosquitoes in an eastern equine encephalomyelitis virus focus in central Alabama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 272-6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.71.272>
- Czerny, L., Strobl, P., 1909. Spanische Dipteren III. Beitrag. *Verhandlungen der Zool. Gesellschaft Wien* 59, 121-301.
- Da Silva, S.M., Ribeiro, V.M., Ribeiro, R.R., Tafuri, W.L., Melo, M.N., Michalick, M.S.M., 2009. First report of vertical transmission of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Vet. Parasitol.* 166, 159-162. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.011>
- Dantas-Torres, F., Tarallo, V.D., Latrofa, M.S., Falchi, A., Lia, R.P., Otranto, D., 2014. Ecology of phlebotomine sand flies and *Leishmania infantum* infection in a rural area of southern Italy. *Acta Trop.* 137, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.034>
- Das, M.L., Roy, L., Rijal, S., Paudel, I.S., Picado, A., Kroeger, A., Petzold, M., Davies, C., Boelaert, M., 2010. Comparative study of kala-azar vector control measures in eastern Nepal. *Acta Trop.* 113, 162-166. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.012>
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop.* 78, 103-116. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00179-0)
- De Almeida, M.E., Steurer, F.J., Koru, O., Herwaldt, B.L., Pieniazek, N.J., Da Silva, A.J., 2011. Identification of *Leishmania* spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of rRNA internal transcribed spacer 2. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3143-3149. <https://doi.org/10.1128/JCM.01177-11>
- De Andrade, H.M., Reis, A.B., dos Santos, S.L., Volpini, Â.C., Marques, M.J., Romanha, A.J., 2006. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet. Parasitol.* 140, 231-238. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.031>
- De Ibarra, A., Snary, D., Howard, J.G., 1982. Monoclonal antibodies to *Leishmania tropica major*: Specificities and antigen location. *Parasitology* 85, 523-531. <https://doi.org/10.1017/S0031182000056304>
- De la Cruz, M.L., Pérez, A., Domínguez, M., Moreno, I., García, N., Martínez, I., Navarro, A., Domínguez, L., Álvarez, J., 2016. Assessment of the sensitivity and specificity of serological (IFAT) and molecular (direct-PCR) techniques for diagnosis of leishmaniasis in lagomorphs using a Bayesian approach. *Vet. Med. Sci.* 2, 211-220. <https://doi.org/10.1002/vms3.37>
- De Souza Rocha, L., Dos Santos, C.B., Falqueto, A., Grimaldi, G., Cupolillo, E., 2010. Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and *Leishmania* from antropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in southeast Brazil. *Parasitol. Res.* 107, 465-468. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1903-1>
- Degrave, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U., 1994. Use of molecular probes

Bibliografía

- and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 89, 463-469. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761994000300032>
- Del Río, L., Chitimia, L., Cubas, A., Victoriano, I., De la Rúa, P., Gerrikagoitia, X., Barral, M., Muñoz-García, C.I., Goyena, E., García-Martínez, D., Fisa, R., Riera, C., Murcia, L., Segovia, M., Berriatua, E., 2014. Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. Prev. Vet. Med. 113, 430-5. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.12.001>
- Demir, S., Karakuş, M., 2015. Natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus sergenti* (Diptera: Phlebotominae) in an endemic focus of cutaneous leishmaniasis in Şanlıurfa, Turkey. Acta Trop. 149, 45-48. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.010>
- Depaquit, J., 2014. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: Review and perspectives. Infect. Genet. Evol. 28, 744-756. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.027>
- Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F., Andry, P.E., Peyrefitte, C., 2010. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. Eurosurveillance 15, 19507. <https://doi.org/10.2807/es.15.10.19507-en>
- Depaquit, J., Leger, N., Killick-Kendrick, R., 1998. Description de *Phlebotomus* (Paraphlebotomus) *riouxi* n. sp. (Diptera-Psychodidae) d'Afrique du Nord. Parasite 5, 151-158. <https://doi.org/10.1051/parasite/1998052151>
- Dereure, J., Boni, M., Pratlong, F., El Hadi Osman, M., Bucheton, B., El-Safi, S., Feugier, E., Musa, M.K., Davoust, B., Dessein, A., Dedet, J.P., 2000. Visceral leishmaniasis in Sudan: First identifications of *Leishmania* from dogs. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94, 154-155. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90253-0](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90253-0)
- Dereure, J., El-Safi, S.H., Bucheton, B., Boni, M., Kheir, M.M., Davoust, B., Pratlong, F., Feugier, E., Lambert, M., Dessein, A., Dedet, J.P., 2003. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: Parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. Microbes Infect. 5, 1103-1108. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.07.003>
- Dereure, J., Rioux, J.A., Gallego, M., Perieres, J., Pratlong, F., Mahjour, J., Saddiki, H., 1991. Short Report: *Leishmania tropica* infection in dogs in Morocco. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 85, 595.
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 27, 305-318. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>
- Desjeux, P., 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 95, 239-243. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90223-8](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90223-8)
- Dhiman, R.C., 1995. Effect of minor engineering intervention in the control of breeding of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) sandflies. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 26, 368-370.
- Di Muccio, T., Scalone, A., Bruno, A., Marangi, M., Grande, R., Armignacco, O., Gradoni, L., Gramiccia, M., 2015. Epidemiology of imported leishmaniasis in Italy: Implications for a European endemic country. PLoS One 10, 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129418>
- Díaz-Espíñeira, M.M., Slappendel, R.J., 1997. A case of autochthonous canine leishmaniasis in the Netherlands. Vet. Q. 19, 69-71. <https://doi.org/10.1080/01652176.1997.9694744>
- Díaz-Sáez, V., Merino-Espinosa, G., Morales-Yuste, M., Corpas-López, V., Pratlong, F., Morillas-

- Márquez, F., Martín-Sánchez, J., 2014. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: Epidemiological consequences. *Vet. Parasitol.* 202, 119-127. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.029>
- Dinesh, D.S., Das, P., Picado, A., Davies, C., Speybroeck, N., Ostyn, B., Boelaert, M., Coosemans, M., 2008. Long-lasting insecticidal nets fail at household level to reduce abundance of sandfly vector *Phlebotomus argentipes* in treated houses in Bihar (India). *Trop. Med. Int. Heal.* 13, 953-958. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2008.02096.x>
- Dirección General de Agricultura y Ganadería y Dirección General del Medio Ambiente. Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio. Comunidad de Madrid. Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A., 2018. Medidas de control ambiental en el brote de leishmaniasis de la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. En: Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. Papel de las liebres y los conejos como reservorios. Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, España. ISBN: 978-84-541-3625-6, pp. 231-244.
- Dolmatova, A., Demina, N., 1971. Les phlébotomes (Phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent, en: Étude anatomique et physiologique des Phlebotominae ailés. Éditions Off Rech Sci Tech Outre-Mer, Paris, pp. 89-95.
- Dostálová, A., Volf, P., 2012. *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasit. Vectors* 5, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>
- Dougall, A., Shilton, C., Low Choy, J., Alexander, B., Walton, S., 2009. New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in northern Australian macropods. *Epidemiol. Infect.* 137, 1516-1520. <https://doi.org/10.1017/S0950268809002313>
- Dougherty, M.J., Hamilton, J.G.C., Ward, R.D., 1994. Isolation of oviposition pheromone from the eggs of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Med. Vet. Entomol.* 8, 119-124. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1994.tb00150.x>
- Du, R., Hotez, P.J., Al-Salem, W.S., Acosta Serrano, A., 2016. Old World cutaneous leishmaniasis and refugee crises in the Middle East and North Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004545>
- Dvorak, V., Halada, P., Hlavackova, K., Dokianakis, E., Antoniou, M., Volf, P., 2014. Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Parasit. Vectors* 7, 21. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-21>
- Dvorak, V., Shaw, J., Volf, P., 2018. Parasite biology: the vectors. En: *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases* por Bruschi, F. y Gradoni, L. Ed: Springer, Switzerland. ISBN 978-3-319-72385-3. pp. 31-77. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>
- Ebani, V.V., Poli, A., Rocchigiani, G., Bertelloni, F., Nardoni, S., Papini, R.A., Mancianti, F., 2016. Serological survey on some pathogens in wild brown hares (*Lepus europaeus*) in Central Italy. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9, 465-469. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.03.032>
- Ehehalt, U., Schunk, M., Jensenius, M., Van Genderen, P.J.J., Gkrania Klotsas, E., Chappuis, F., Schlagenhauf, P., Castelli, F., López-Vélez, R., Parola, P., Burchard, G.D., Cramer, J.P., 2014. Leishmaniasis acquired by travellers to endemic regions in Europe: A EuroTravNet multi-centre study. *Travel Med. Infect. Dis.* 12, 167-172. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2013.12.003>

Bibliografía

- Ejov, M., Dagne, D., 2014. Strategic framework for leishmaniasis control in the WHO European Region 2014-2020. World Heal. Organ. 1-17.
- El Kammah, K., 1973. Studies of autogeny in *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera:Psychodidae). J.Med.Entomol. 10, 261-263. <https://doi.org/10.1093/jmedent/10.3.261>
- El Tai, N.O., El Fari, M., Mauricio, I., Miles, M.A., Oskam, L., El Safi, S.H., Presber, W.H., Schönián, G., 2001. *Leishmania donovani*: Intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. Exp. Parasitol. 97, 35-44. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4592>
- El Tai, N.O., Osman, O.F., El Fari, M., Presber, W., Schönián, G., 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) and sequencing. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94, 575-579. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90093-2](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90093-2)
- Ellegren, H., 2000. Microsatellite mutations in the germline : implications for evolutionary inference. Trends Genet. 16, 551-558. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02139-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02139-9)
- Elnaïem, D.A., Hassan, M.M., Maingon, R., Nureldin, G.H., Mekawi, A.M., Miles, M., Ward, R.D., 2001. The egyptian mongoose, *Herpestes ichneumon*, is a possible reservoir host of visceral leishmaniasis in eastern Sudan. Parasitology 122, 531-536. <https://doi.org/10.1017/S0031182001007594>
- Encinas Grandes, A., Gómez-Bautista, M., Martín Novo, M., Simón Martín, F., 1988. Leishmaniasis in the province of Salamanca, Spain. Prevalence in dogs and seasonal dynamics of vectors. Ann. Parasitol. Hum. Comp 63, 387-397.
- Es-Sette, N., Ajaoud, M., Laamrani-Idrissi, A., Mellouki, F., Lemrani, M., 2014. Molecular detection and identification of *Leishmania* infection in naturally infected sand flies in a focus of cutaneous leishmaniasis in northern Morocco. Parasit. Vectors 7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-305>
- Esch, K.J., Petersen, C.A., 2013. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. Clin. Microbiol. Rev. 26, 58-85. <https://doi.org/10.1128/CMR.00067-12>
- Espinosa, O.A., Serrano, M.G., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., Shaw, J.J., 2016. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitology 1-13. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002092>
- Esseghir, S., Ready, P.D., Ben-Ismaïl, R., 2000. Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus Larrousius coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the mediterranean subregion. Biol. J. Linn. Soc. 70, 189-219. <https://doi.org/10.1006/bjil.1999.0393>
- Evers, D.L., Frye, F.A., Weina, P.J., 2018. A simple empirical algorithm to distinguish among *Leishmania braziliensis*, *major*, and *tropica* species by MALDI-TOF mass spectrometry. J. Microbiol. Methods 148, 46-48. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.12.009>
- Faiman, R., Abbasi, I., Jaffe, C., Motro, Y., Nasereddin, A., Schnur, L.F., Torem, M., Pratlong, F., Dedet, J.P., Warburg, A., 2013. A newly emerged cutaneous leishmaniasis focus in northern Israel and two new reservoir hosts of *Leishmania major*. PLoS Negl. Trop. Dis. 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002058>
- Faucher, B., Bichaud, L., Charrel, R., Mary, C., Izri, A., de Lamballerie, X., Piarroux, R., 2014.

- Presence of sandflies infected with *Leishmania infantum* and Massilia virus in the Marseille urban area. Clin. Microbiol. Infect. 20, O340-343. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12404>
- Feliciangeli, M.D., 2006. Sobre los flebotomos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), con especial referencia a las especies conocidas en Venezuela. Acta Biol. Venez 26, 61-80.
- Feliciangeli, M.D., 2004. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Med. Vet. Entomol. 18, 71-80. <https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2004.0487.x>
- Fernández-Bellón, H., Solano-Gallego, L., Bardagí, M., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L., 2006. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. Vet. Parasitol. 135, 181-185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.09.007>
- Fernández, M.S., Santini, M.S., Cavia, R., Sandoval, A.E., Pérez, A.A., Acardi, S., Salomón, O.D., 2013. Spatial and temporal changes in *Lutzomyia longipalpis* abundance, a *Leishmania infantum* vector in an urban area in northeastern Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108, 817-824. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130047>
- Ferreira, T. de S., Minuzzi-Souza, T.T.C., De Andrade, A.J., Coelho, T.O., Rocha, D. de A., Obara, M.T., Hecht, M., Nitz, N., Gurgel-Gonçalves, R., 2015. Molecular detection of *Trypanosoma* sp. and *Blastocrithidia* sp. (Trypanosomatidae) in phlebotomine sand flies (Psychodidae) in the Federal District of Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 48, 776-779. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0076-2015>
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portús, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) The example of the Priorat focus. Vet. Parasitol. 83, 87-97. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00074-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00074-6)
- Fischer, D., Moeller, P., Thomas, S.M., Naucke, T.J., Beierkuhnlein, C., 2011. Combining climatic projections and dispersal ability: A method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change. PLoS Negl. Trop. Dis. 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001407>
- Fonteles, R.S., Pereira Filho, A.A., Moraes, J.L.P., Pereira, S.R.F., Rodrigues, B.L., Rebêlo, J.M.M., 2017. Detection of *Leishmania* DNA and blood meal identification in sand flies (Diptera: Psychodidae) from Lençóis Maranhenses National Park Region, Brazil. J. Med. Entomol. 1-7. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx230>
- Fossati, F., Maroli, M., 1986. Laboratory tests of three repellents against *Phlebotomus perniciosus* (Diptera:Psychodidae). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80, 771-773. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(86\)90382-2](https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90382-2)
- Foulet, F., Botterel, F., Buffet, P., Morizot, G., Rivollet, D., Deniau, M., Pratlong, F., Costa, J.-M., Bretagne, S., 2007. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome *b* gene. J. Clin. Microbiol. 45, 2110-2115. <https://doi.org/10.1128/JCM.02555-06>
- Fraga, J., Montalvo, A.M., De Doncker, S., Dujardin, J.C., Van der Auwera, G., 2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. Infect. Genet. Evol. 10, 238-245. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007>
- França, A.D.O., Pompilio, M.A., Jardim, E.R., Oliveira, P. De, Oliveira, L., Pereira, R., Pontes, C., Lima, B., Goto, H., Carmen, M., Sánchez, A., Fujimori, M., Fatima, M. De, Matos, C., Moraes, M.E., Dorval, C., 2018. *Leishmania* infection in blood donors: A new challenge in leishmaniasis transmission? PLoS One 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198199>

Bibliografía

- Frankenburg, S., Londner, M. V., Schlein, Y., Schnur, L.F., 1985. The development of a solid phase radioimmunoassay for the detection of leishmanial parasites in the sand fly. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 266-269. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1985.34.266>
- Gage, K.L., Burkot, T.R., Eisen, R.J., Hayes, E.B., 2008. Climate and vector-borne diseases. *Am. J. Prev. Med.* 35, 436-450. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2008.08.030>
- Gaglio, G., Napoli, E., Falsone, L., Giannetto, S., Brianti, E., 2017. Field evaluation of a new light trap for phlebotomine sand flies. *Acta Trop.* 174, 114-117. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.011>
- Gállego, M., Rioux, J.A., Rispail, P., Guilvard, E., Gállego, J., Portús, M., Delabre, A., Bastien, P., Martínez-Ortega, E., Fisa, R., 1990. Primera denuncia de flebotomos (Diptera, Phlebotomidae) en la provincia de Lérida (España, Cataluña). *Rev. Iber. Parasitol.*, 50:123-127.
- Gállego-Berenguer, J., Botet-Fregola, J., Gállego-Culleré, M., Portús-Vinyeta, M., 1992. Los flebotomos de la España Peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura, en: «In memoriam» al Profesor Doctor D.F. de P. Martínez Gómez. Barcelona, pp. 580-600.
- Gálvez, R., Descalzo, M.A., Miró, G., Jiménez, M.I., Martín, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E., Molina, R., 2010. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop.* 115, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.02.009>
- García, A.L., Kindt, A., Quispe Tintaya, K.W., Bermúdez, H., Llanos, A., Arévalo, J., Bañuls, A.L., De Doncker, S., Le Ray, D., Dujardin, J.C., 2005. American tegumentary leishmaniasis: Antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect. Genet. Evol.* 5, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.07.003>
- García, L., Kindt, A., Bermúdez, H., Llanos-Cuentas, A., Doncker, S. De, Arévalo, J., Wilber, K., Quispe-Tintaya, K.W., Dujardin, J.-C., 2004. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2294-2297. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294>
- García, N., Moreno, I., Álvarez, J., De La Cruz, M.L., Navarro, A., Pérez-Sancho, M., García-Seco, T., Rodríguez-Bertos, A., Conty, M.L., Toraño, A., Prieto, A., Domínguez, L., Domínguez, M., 2014. Evidence of *Leishmania infantum* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a natural area in Madrid, Spain. *Biomed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/318254>
- Gebresilassie, A., Yared, S., Aklilu, E., Kirstein, O.D., Moncaz, A., Tekie, H., Balkew, M., Warburg, A., Hailu, A., Gebre-Michael, T., 2015. The influence of moonlight and lunar periodicity on the efficacy of CDC light trap in sampling *Phlebotomus (larroussius) orientalis* Parrot, 1936 and other *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Psychodidae) in Ethiopia. *Parasit. Vectors* 8, 1-7. doi:10.1186/s13071-015-0723-7
- Gil-Collado, J., Morillas-Márquez, F., Sanchís, M.C., 1989. Los flebotomos en España. *Rev. Sanid. Pública* 63, 15-34.
- Gil-Prieto, R., Walter, S., Alvar, J., De Miguel, Á.G., 2011. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997-2008). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85, 820-825. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0310>
- Giorgobiani, E., Lawyer, P.G., Babuadze, G., Dolidze, N., Jochim, R.C., Tskhvaradze, L.,

- Kikaleishvili, K., Kamhawi, S., 2012. Incrimination of *Phlebotomus kandelakii* and *Phlebotomus balcanicus* as vectors of *Leishmania infantum* in Tbilisi, Georgia. PLoS Negl. Trop. Dis. 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001609>
- Githeko, A., Lindsay, S., Confalonieri, U., Patz, J., 2000. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. Bull. World Health Organ. 78, 1136-1147. <https://doi.org/10.1590/S0042-96862000000900009>
- Gómez-Hernández, C., Bento, E.C., Rezende-Oliveira, K., Nascentes, G.A.N., Barbosa, C.G., Batista, L.R., Tiburcio, M.G.S., Pedrosa, A.L., Lages-Silva, E., Ramírez, J.D., Ramirez, L.E., 2017. *Leishmania* infection in bats from a non-endemic region of leishmaniasis in Brazil. Parasitology 144, 1980-1985. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001500>
- Gómez-Saladín, E., Doud, C.W., Maroli, M., 2005. Short report: Surveillance of *Leishmania* sp. among sand flies in Sicily (Italy) using a fluorogenic real-time polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72, 138-141. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.72.2.138> [pii]
- González, E., Gállego, M., Molina, R., Abras, A., Magdalena, M., Ballart, C., Fernández, A., Jiménez, M., 2015. Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome *b* gene. Acta Trop. 152. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.020>
- González, E., Jiménez, M., Hernández, S., Martí-Martín, I., Molina, R., 2017. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012-2014): Seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. Parasit. Vectors 10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2309-z>
- González, E., Molina, R., Tello, A., Iriso, A., Vázquez, A., Jiménez, M., 2016b. Blood feeding behavior of *Phlebotomus perniciosus* collected in the human leishmaniasis focus of southwest Madrid, Spain, during the period 2012-2015. En: Depaquit y col., Proceedings of the IX International Symposium on Phlebotomine Sandflies, ISOPS IX, Reims, France, 28 junio-1 julio, 2016. Publicado en Parasite, vol. 23.
- González, E., Tello, A., Molina, R., Iriso, A., Vázquez, A., Jiménez, M., 2016a. Anthropophilic behavior and *Leishmania* spp. detection in *Sergentomyia minuta* collected in the human leishmaniasis focus of Madrid, Spain. En: Depaquit y col., Proceedings of the IX International Symposium on Phlebotomine Sandflies, ISOPS IX, Reims, France, 28 junio-1 julio, 2016. Publicado en Parasite, vol. 23.
- Gortázar, C., Reperant, L.A., Kuiken, T., de la Fuente, J., Boadella, M., Martínez-Lopez, B., Ruiz-Fons, F., Estrada-Peña, A., Drosten, C., Medley, G., Ostfeld, R., Peterson, T., VerCauteren, K.C., Menge, C., Artois, M., Schultsz, C., Delahay, R., Serra-Cobo, J., Poulin, R., Keck, F., Aguirre, A.A., Henttonen, H., Dobson, A.P., Kutz, S., Lubroth, J., Mysterud, A., 2014. Crossing the interspecies barrier: Opening the door to zoonotic pathogens. PLoS Pathog. 10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004129>
- Gossage, S.M., Rogers, M.E., Bates, P.A., 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. Int. J. Parasitol. 33, 1027-1034. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00142-5)
- Gradoni, L., Gramiccia, M., Léger, N., Pesson, B., Madulo-Leblond, G., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Walton, B.C., 1991. Isoenzyme characterization of *Leishmania* from man, dog and sandflies in the Maltese Islands. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 85, 217-219. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(91\)90027-V](https://doi.org/10.1016/0035-9203(91)90027-V)

Bibliografía

- Gradoni, L., López-Vélez, R., Mokni, M., 2017. Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 1989. Caractérisation enzymatique de *Trypanosoma platydictyli* Catoullard, 1909 isolé de *Sergentomyia minuta minuta* Rondani, 1843 en Italie. Ann. Parasitol. Hum. Comparée 64, 154-156.
- Grandadam, M., Caro, V., Plumet, S., Thiberge, J.-M., Souarès, Y., Failloux, A.-B., Tolou, H.J., Budelot, M., Cosserat, D., Leparç-Goffart, I., Desprès, P., 2011. Chikungunya Virus, Southeastern France. Emerg. Infect. Dis. 17, 910-913. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101873>
- Grewal, M.S., 1957. The life cycle of the British rabbit trypanosome, *Trypanosoma nabiasi* Railliet, 1895. Parasitology 47, 100-118. <https://doi.org/10.1017/S0031182000021806>
- Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribáñez, M.A., Alvar, J., Castillo, J.A., 2000. Canine leishmaniasis transmission: Higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. Res. Vet. Sci. 69, 249-253. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2000.0419>
- Gubler, D.J., 1998. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. Emerg. Infect. Dis. 4, 442-50. <https://doi.org/10.3201/eid0403.980326>
- Guerbouj, S., Chemkhi, J., Kaabi, B., Rahali, A., Ismail, R. Ben, Guizani, I., 2007. Natural infection of *Phlebotomus* (Larroussius) *langeroni* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania infantum* in Tunisia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 101, 372-377. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.07.007>
- Guernaoui, S., Pesson, B., Boumezzough, A., Pichon, G., 2005. Distribution of phlebotomine sandflies, of the subgenus Larroussius, in Morocco. Med. Vet. Entomol. 19, 111-115. <https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2004.00548.x>
- Guilvard, E., Gállego, M., Moreno, G., Fisa, R., Rispail, P., Pratlong, F., Martínez-Ortega, E., Gállego, J., Rioux, J., 1996. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) par *Leishmania infantum* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) en Catalogne (Espagne). Parasite 3, 191-192.
- Guy, M.W., Killick-Kendrick, R., Gill, G.S., Rioux, J.A., Bray, R.S., 1984. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in the Cévennes by bloodmeal analyses. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 59, 449-458.
- Hajj, R. El, Hajj, H. El, Khalifeh, I., 2018. Fatal visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*, Lebanon. Emerg. Infect. Dis. 24, 1-2. <https://doi.org/10.3201/eid2405.180019>
- Hajjarian, H., Mohebbi, M., Mamishi, S., Vasigheh, F., Oshaghi, M.A., Naddaf, S.R., Teimouri, A., Edrissian, G.H., Zarei, Z., 2013. Molecular identification and polymorphism determination of cutaneous and visceral leishmaniasis agents isolated from human and animal hosts in Iran. Biomed Res. Int. 2013, 7. <https://doi.org/10.1155/2013/789326>
- Halada, P., Hlavackova, K., Dvorak, V., Volf, P., 2018. Identification of immature stages of phlebotomine sand flies using MALDI-TOF MS and mapping of mass spectra during sand fly life cycle. Insect Biochem. Mol. Biol. 93, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.12.005>
- Hamarsheh, O., Amro, A., 2011. Characterization of simple sequence repeats (SSRs) from *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) expressed sequence tags (ESTs). Parasit. Vectors 4, 189. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-189>

- Hamarsheh, O., Karakuş, M., Azmi, K., Jaouadi, K., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Krüger, A., Amro, A., Kenawy, M.A., Dokhan, M.R., Abdeen, Z., McDowell, M.A., 2018. Development of polymorphic EST microsatellite markers for the sand fly, *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Parasit. Vectors* 11, 3-7. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2770-3>
- Hamilton, P.B., Stevens, J.R., Holz, P., Boag, B., Cooke, B., Gibson, W.C., 2005. The inadvertent introduction into Australia of *Trypanosoma nabiasi*, the trypanosome of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and its potential for biocontrol. *Mol. Ecol.* 14, 3167-3175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02602.x>
- Handman, E., Bullen, D.V.R., 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 18, 332-334. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02352-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02352-8)
- Haouas, N., Chaker, E., Chargui, N., Gorcii, M., Belhadj, S., Kallel, K., Aoun, K., Akrou, F.M., Ben Said, M., Pralong, F., Dedet, J.P., Mezhoud, H., Lami, P., Zribi, M., Azaiez, R., Babba, H., 2012. Geographical distribution updating of Tunisian leishmaniasis foci: About the isoenzymatic analysis of 694 strains. *Acta Trop.* 124, 221-228. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.012>
- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, R., Dedet, J.P., Babba, H., Ravel, C., 2007. Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 1054-1059. <https://doi.org/10.1016/j.ajtmh.2007.06.001> [pii]
- Harhay, M.O., Oliaro, P.L., Costa, D.L., Costa, C.H.N., 2011. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 27, 403-409. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001>
- Hartl, F., Hayer-Hartl, M., 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852. <https://doi.org/10.1126/science.1068408>
- Hassan, M.M., Osman, O.F., El-Raba'a, F.M., Schallig, H.D., Elnaiem, D.E.A., 2009. Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. *Parasit. Vectors* 2, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-26>
- Hay, S.I., Tatem, A.J., Graham, A.J., Goetz, S.J., Rogers, D.J., 2006. Global environmental data for mapping infectious disease distribution. *Nat. Rev. Microbiol.* 62, 37-77. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)62002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)62002-7)
- Hayani, K., Dandashli, A., Weisshaar, E., 2015. Cutaneous leishmaniasis in Syria: Clinical features, current status and the effects of war. *Acta Derm. Venereol.* 95, 62-66. <https://doi.org/10.2340/00015555-1988>
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270, 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hernández, C., Álvarez, C., González, C., Ayala, M.S., León, C.M., Ramírez, J.D., 2014. Identification of six New World *Leishmania* species through the implementation of a high-resolution melting (HRM) genotyping assay. *Parasit. Vectors* 7, 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0501-y>
- Herrador, Z., Gherasim, A., Jimenez, B.C., Granados, M., San Martín, J.V., Aparicio, P., 2015. Epidemiological changes in leishmaniasis in Spain according to hospitalization-based records, 1997–2011: Raising awareness towards Leishmaniasis in non-HIV patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003594>
- Herrera, G., Hernández, C., Ayala, M.S., Flórez, C., Teherán, A.A., Ramírez, J.D., 2017.

Bibliografía

- Evaluation of a multilocus sequence typing (MLST) scheme for *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *Leishmania* (Viannia) *panamensis* in Colombia. *Parasit. Vectors* 10, 236. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2175-8>
- Hervás, J., Méndez, A., Carrasco, L., Gómez-Villamandos, J.C., 1996. Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canis aureus*). *Vet. Rec.* 293-295. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(75\)80147-0](https://doi.org/10.1016/0039-9140(75)80147-0)
- Hide, M., Bañuls, A.L., 2008. Polymorphisms of *cpb* multicopy genes in the *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* complex. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 105-106. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.09.013>
- Hide, M., Bañuls, A.L., 2006. Species-specific PCR assay for *L. infantum*/*L. donovani* discrimination. *Acta Trop.* 100, 241-245. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.10.012>
- Hoare, C., 1972. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hoel, D.F., Fawaz, E.Y., Butler, J.E., Watany, N., El-Hossaru, S.S., 2007. Response of phlebotomine sand flies to light-emitting diode-modified light traps in southern Egypt. *J. Vector Ecol.* 32, 226-234. [https://doi.org/10.3376/1081-1710\(2007\)32](https://doi.org/10.3376/1081-1710(2007)32)
- Hussain, M., Munir, S., Jamal, M.A., Ayaz, S., Akhoundi, M., Mohamed, K., 2017. Epidemic outbreak of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kohat District, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Acta Trop.* 172, 147-155. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.035>
- Ibrahim, M.E., Barker, D.C., 2001. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. *Infect Genet Evol* 1, 61-68. <https://doi.org/S1567134801000090> [pii]
- Ilg, T., 2001. Lipophosphoglycan of the protozoan parasite *Leishmania*: stage- and species-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals. *Med. Microbiol. Immunol.* 190, 13-17. <https://doi.org/10.1007/s004300100071>
- Inbar, E., Lawyer, P., Sacks, D., Podini, D., 2016. The potential use of forensic DNA methods applied to sand fly blood meal analysis to identify the infection reservoirs of anthroponotic visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004706>
- INE, 2018. Madrid: Población por municipios y sexo. (2881) <http://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?t=2881>
- Instituto de Investigación para el Desarrollo, 2018. <http://leishmania.ird.fr/#>
- Instituto Geográfico Nacional, 2018. Astronomía: Hora, salidas y puestas de sol. <http://astronomia.ign.es/hora-salidas-y-puestas-de-sol>
- Iriso-Calle, A., Bueno-Marí, R., De las Heras, E., Lucientes, J., Molina, R., 2017. Cambio climático en España y su influencia en las enfermedades de transmisión vectorial. *Rev. Salud Ambient.* 17, 70-86.
- Jamjoom, M.B., Ashford, R.W., Bates, P.A., Chance, M.L., Kemp, S.J., Watts, P.C., Noyes, H.A., 2004. *Leishmania donovani* is the only cause of visceral leishmaniasis in East Africa; previous descriptions of *L. infantum* and «*L. archibaldi*» from this region are a consequence of convergent evolution in the isoenzyme data. *Parasitology* 129, 399-409. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005955>

- Jaouadi, K., Bettaieb, J., Bennour, A., Salem, S., Ghawar, W., Rjeibi, M.R., Khabouchi, N., Gonzalez, J.P., Diouani, M.F., Salah, A. Ben, 2018. Blood meal analysis of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) for *Leishmania* spp. identification and vertebrate blood origin, central Tunisia, 2015-2016. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 98, 146-149. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0313>
- Jaouadi, K., Bettaieb, J., Bennour, A., Salem, S., Rjeibi, M.R., Chaabane, S., Yazidi, R., Khabouchi, N., Gharbi, A., Salah, A. Ben, 2017. First report on natural infection of *Phlebotomus sergenti* with *Leishmania tropica* in a classical focus of *Leishmania major* in Tunisia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 97, 291-294. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0849>
- Jaouadi, K., Ghawar, W., Salem, S., Gharbi, M., Bettaieb, J., Yazidi, R., Harrabi, M., Hamarsheh, O., Ben Salah, A., 2015. First report of naturally infected *Sergentomyia minuta* with *Leishmania major* in Tunisia. *Parasit. Vectors* 8, 1-3. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1269-4>
- Jaouadi, K., Haouas, N., Chaara, D., Boudabous, R., Gorcii, M., Kidar, A., Depaquit, J., Pratlong, F., Dedet, J.P., Babba, H., 2013. Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) bloodmeal sources in Tunisian cutaneous leishmaniasis foci: Could *Sergentomyia minuta*, which is not an exclusive herpetophilic species, be implicated in the transmission of pathogens? *Ann. Entomol. Soc. Am.* 106, 79-85. <https://doi.org/10.1603/AN11186>
- Jiménez, M., Ferrer Dufol, M., Cañavate, C., Gutiérrez Solar, B., Molina, R., Laguna, F., López Vélez, R., Cercenado, E., Daudén, E., Blázquez, J., Ladrón de Guevara, C., Gómez, J., De la Torre, J., Barros, C., Altés, J., Serra, T., Alvar, J., 1995a. Variability of *Leishmania infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiol. Ecol.* 131, 197-204. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07777.x>
- Jiménez, M., González, E., Iriso, A., Marco, E., Alegret, A., Fúster, F., Molina, R., 2013. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol. Res.* 112, 2453-2459. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3406-3>
- Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., Molina, R., 2014. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet. Parasitol.* 202, 296-300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.027>
- Jiménez, M.I., Laguna, F., de la Torre, F., Solis, F., Pratlong, F., Alvar, J., 1995b. New *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* zymodemes responsible for visceral leishmaniasis in patients co-infected with HIV in Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89, 33.
- Jobling, B., Lewis, D.J., 1987. Anatomical drawings of biting flies. British Museum (Natural History) in association with the Wellcome Trust. Londres
- Kamhawi, S., 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 22, 439-445. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.06.012>
- Kamhawi, S., Abdel-Hafez, S., Molyneux, D.H., 1991. Urbanization. How does it affect the behaviour of sandflies? *Parassitologia* 33, 299-306.
- Kamhawi, S., Modi, G.B., Pimenta, P.F.P., Rowton, E., Sacks, D.L., 2000. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology* 121, 25-33. <https://doi.org/10.1017/S0031182099006125>

Bibliografía

- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Van, M.P., Kumar, S., Lawyer, P.G., Turco, S.J., Barillas-Mury, C., Sacks, D.L., Valenzuela, J.G., 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* 119, 329-341. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.009>
- Kanjanopas, K., Siripattanapipong, S., Ninsaeng, U., Hitakarun, A., Jitkaew, S., Kaewtaphaya, P., Tan-ariya, P., Mungthin, M., Charoenwong, C., Leelayoova, S., 2013. *Sergentomyia* (Neophlebotomus) *gemmea*, a potential vector of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. *BMC Infect. Dis.* 13, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-333>
- Karakuş, M., Pekağ Irbaş, M., Demir, S., Eren, H., Töz, S., Özbel, Y., 2017. Molecular screening of *Leishmania* spp. infection and bloodmeals in sandflies from a leishmaniasis focus in southwestern Turkey. *Med. Vet. Entomol.* 31, 224-229. <https://doi.org/10.1111/mve.12216>
- Kassahun, A., Sadlova, J., Dvorak, V., Kostalova, T., Rohousova, I., Frynta, D., Aghova, T., Yasur-Landau, D., Lemma, W., Hailu, A., Baneth, G., Warburg, A., Volf, P., Votypka, J., 2015. Detection of *Leishmania donovani* and *L. tropica* in Ethiopian wild rodents. *Acta Trop.* 145, 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.006>
- Kassem, H.A., El Nogoumy, N.N., El Sawaf, B.M., 2012. Impact of urbanization on the sand fly *Phlebotomus langeroni* Nitzulescu in an old focus of visceral leishmaniasis in Egypt. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 160. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Kato, H., Gómez, E.A., Cáceres, A.G., Vargas, F., Mimori, T., Yamamoto, K., Iwata, H., Korenaga, M., Velez, L., Hashiguchi, Y., 2011. Natural infections of man-biting sand flies by *Leishmania* and *Trypanosoma* species in the northern Peruvian Andes. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11, 515-521. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0138>
- Kato, H., Uezato, H., Sato, H., Bhutto, A.M., Soomro, F.R., Baloch, J.H., Iwata, H., Hashiguchi, Y., 2010. Natural infection of the sand fly *Phlebotomus kazeruni* by *Trypanosoma* species in Pakistan. *Parasit. Vectors* 3, 3-7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-10>
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., Barratt, J., 2017. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasit. Vectors* 10, 1-17. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>
- Kavur, H., Arikan, H., Ozbel, Y., 2017. *Phlebotomus halepensis* (Diptera: Psychodidae) vectorial capacity in Afyon and Nigde Province, Turkey. *J. Med. Entomol.* 1-6. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx210>
- Kavur, H., Eroglu, F., Evyapan, G., Demirkazik, M., Alptekin, D., Koltas, I.S., 2015. Entomological survey for sand fly fauna in Imamoglu Province (cutaneous leishmaniasis endemic region) of Adana, Turkey. *J. Med. Entomol.* 52, 813-818. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv064>
- Keller, J.I., Ballif, B.A., St Clair, R.M., Vincent, J.J., Monroy, M.C., Stevens, L., 2017. Chagas disease vector blood meal sources identified by protein mass spectrometry. *PLoS One* 12, 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189647>
- Kelly, D.W., Mustafa, Z., Dye, C., 1997. Differential application of lambda-cyhalothrin to control the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Med. Vet. Entomol.* 11, 13-24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1997.tb00285.x>
- Kelly, P.H., Bahr, S.M., Serafim, T.D., Ajami, N.J., Petrosino, J.F., Meneses, C., Kirby, J.R., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., Wilson, M.E., 2017. The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. *MBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.01121-16>
- Kent, R.J., 2009. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to

- ecological and vector-borne disease studies. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 4-18. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02469.x>
- Kent, R.J., Norris, D.E., 2005. Identification of mammalian blood meals in mosquitos by a multiplexed PCR targeting cytochrome *b*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4, 336-342. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001449.Engineering>
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279-289. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(99\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00046-2)
- Killick-Kendrick, R., 1995. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bull. Soc. Pathol. exotique Fil.* 78, 747-755.
- Killick-Kendrick, R., 1990a. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* 4, 1-24.
- Killick-Kendrick, R., 1990b. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann. Parasitol. Hum. Comparée* 65, 37-42. <https://doi.org/10.1051/parasite/1990651037>
- Killick-Kendrick, M., Killick-Kendrick, R., 1991. The initial establishment of sandfly colonies. *Parassitologia* 33, 315-320.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., 1987. Élevage en laboratoire de *Phlebotomus ariasi* (Diptera: Psychodidae). *Ann. Parasitol. Hum. Comparée* 62, 354-356. <https://doi.org/10.1051/parasite/1987624354>
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Focheux, C., Dereure, J., Puech, M.P., Cadiergues, M.C., 1997. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.* 11, 105-111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1997.tb00298.x>
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Tang, Y., 1994. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: the low susceptibility of *Phlebotomus papatasi* to *Leishmania tropica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 252-253.
- Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., 2002. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia* 44, 67-71.
- Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., Bailly, M., Guy, M.W., Wilkes, T.J., Guy, F.M., Davidson, I., Knecht, R., Ward, R.D., Guilvard, E., Perieres, J., Dubois, H., 1984. Ecology of Leishmaniasis in the South of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 59, 555-572.
- Killick-Kendrick, R., Wilkes, T.J., Bailly, M., Bailly, I., Righton, L.A., 1986. Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 138-142. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(86\)90213-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90213-0)
- Kilpatrick, A.M., Randolph, S.E., 2012. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet* 380, 1946-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61151-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61151-9)
- Kishore, K., Kumar, V., Kesari, S., Dinesh, D.S., Kumar, A.J., Das, P., Bhattacharya, S.K., 2006. Vector control in leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123, 467-472.

Bibliografía

- Knowlton, N., Weigt, L.A., 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 265, 2257-2263. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0568>
- Kocher, A., Valière, S., Bañuls, A., Muriénne, J., 2017. High-throughput sequencing of kDNA amplicons for the analysis of *Leishmania* minicircles and identification of Neotropical species. *Parasitology*. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002013>
- Kostich, D., 1951. Source determination of blood meal in sandflies (Phlebotominae) in Yugoslavia (Dobricky County): 2.760 haemoprecipitin tests. *Acta Trop.* 8, 131-135.
- Krenn, H.W., Aspöck, H., 2012. Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. *Arthropod Struct. Dev.* 41, 101-118. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2011.12.001>
- Kreutzer, R.D., Christensen, H.A., 1980. Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 199-208. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.199>
- Kuhls, K., Alam, M.Z., Cupolillo, E., Ferreira, G.E.M., Mauricio, I.L., Oddone, R., Feliciangeli, M.D., Wirth, T., Miles, M.A., Schönian, G., 2011. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001155>
- Kuhls, K., Mauricio, I.L., Pratlong, F., Presber, W., Schönian, G., 2005. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect.* 7, 1224-1234. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.009>
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kumar, V., Rama, A., Kesari, S., Bhunia, G.S., Dinesh, D.S., Das, P., 2013. Oviposition behaviour of *Phlebotomus argentipes*-a laboratory-based study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 1065-7. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130003>
- Lachaud, L., Fernández-Arévalo, A., Normand, A.C., Lami, P., Nabet, C., Donnadieu, J.L., Piarroux, M., Djenad, F., Cassagne, C., Ravel, C., Tebar, S., Llovet, T., Blanchet, D., Demar, M., Harrat, Z., Aoun, K., Bastien, P., Muñoz, C., Gállego, M., Piarroux, R., 2017. Identification of *Leishmania* by MALDI-TOF mass spectrometry using a free web-based application and a dedicated mass spectral library. *J. Clin. Microbiol.* JCM.00845-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.00845-17>
- Lafri, I., Almeras, L., Bitam, I., Caputo, A., Yssouf, A., Forestier, C.L., Izri, A., Raoult, D., Parola, P., 2016. Identification of Algerian field-caught phlebotomine sand fly vectors by MALDI-TOF MS. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004351>
- Lainson, R., Braga, R., De Souza, A., Pova, M., Ishikawa, E., da Silveira, F., 1989. *Leishmania* (Viannia) *shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 64, 200-207. <https://doi.org/10.1051/parasite/1989643200>
- Lainson, R., Ready, P.D., Shaw, J.J., 1979. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 206, 307-318. <https://doi.org/10.1098/rspb.1979.0107>
- Lainson, R., Shaw, J.J., 1989. *Leishmania* (Viannia) *naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 64, 3-9.

<https://doi.org/10.1051/parasite/19896413>

- Lambin, E.F., Tran, A., Vanwambeke, S.O., Linard, C., Soti, V., 2010. Pathogenic landscapes: interactions between land, people, disease vectors, and their animal hosts. *Int. J. Health Geogr.* 9, 54. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-9-54>
- Lara-Silva, F. de O., Michalsky, É.M., Fortes-Dias, C.L., Fiuza, V. de O.P., Pessanha, J.E.M., Regina-Silva, S., de Avelar, D.M., Silva, M.A., Lima, A.C.V.M. da R., da Costa, A.J.A., Machado-Coelho, G.L.L., Dias, E.S., 2015. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* 148, 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.002>
- Latrofa, M.S., Iatta, R., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Gabrielli, S., Pombi, M., Gradoni, L., Otranto, D., 2018. Detection of *Leishmania infantum* DNA in phlebotomine sand flies from an area where canine leishmaniosis is endemic in southern Italy. *Vet. Parasitol.* 253, 39-42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.006>
- Laurenti, M.D., Rossi, C.N., Matta, V.L.R. da, Tomokane, T.Y., Corbett, C.E.P., Secundino, N.F.C., Pimenta, P.F.P., Marcondes, M., 2013. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* to the natural vector. *Vet. Parasitol.* 196, 296-300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.017>
- Le Blancq, S.M., Belehu, A., Peters, W., 1986a. *Leishmania* in the Old World: 3. the distribution of *L. aethiopica* zymodemes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 367-377. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(86\)90320-2](https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90320-2)
- Le Blancq, S.M., Peters, W., 1986. *Leishmania* in the Old World: 4. The distribution of *L. donovani* sensu lato zymodemes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 367-377. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(86\)90320-2](https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90320-2)
- Le Blancq, S.M., Schnur, L.F., Peters, W., 1986b. *Leishmania* in the Old World: 1. The geographical and hostal distribution of *L. major* zymodemes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 360-366. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(86\)90318-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90318-4)
- Lee, J.H., Hassan, H., Hill, G., Cupp, E.W., Higazi, T.B., Mitchell, C.J., Godsey, M.S., Unnasch, T.R., 2002. Identification of mosquito avian-derived blood meals by polymerase chain reaction-heteroduplex analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 599-604.
- Léger, N., Depaquit, J., 1999. Les phlébotomes (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), en: Dedet, J.P. (Ed.), *Les leishmanioses*. Ellipses, Paris, pp. 90-108.
- Lehane, M.J., 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 525-50. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.525>
- Lehrter, V., Bañuls, A.-L., Léger, N., Rioux, J.-A., Depaquit, J., 2017. *Phlebotomus* (Paraphlebotomus) *chabaudi* and *Phlebotomus riouxi*: closely related species or synonyms? *Parasite* 24, 47. doi:10.1051/parasite/2017050
- Lemma, W., Bizuneh, A., Tekie, H., Belay, H., Wondimu, H., Kassahun, A., Shiferaw, W., Balkew, M., Abassi, I., Baneth, G., Hailu, A., 2017. Preliminary study on investigation of zoonotic visceral leishmaniasis in endemic foci of Ethiopia by detecting *Leishmania* infections in rodents. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10, 418-422. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.03.018>
- Lemma, W., Tekie, H., Abassi, I., Balkew, M., Gebre-Michael, T., Warburg, A., Hailu, A., 2014. Nocturnal activities and host preferences of *Phlebotomus orientalis* in extra-domestic habitats

Bibliografía

- of Kafta-Humera lowlands, Kala-azar endemic, Northwest Ethiopia. *Parasites and Vectors* 7. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0594-3>
- Leng, Y.J., 1987. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, south-west China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 81, 311-317. <https://doi.org/10.1080/00034983.1987.11812125>
- León-Sanz, C.M., Collantes, F., Martínez-Ortega, E., 1999. Revisión de la colección Nájera de flebotomos depositada en el Museo de Ciencias Naturales de Madrid. *Graellsia* 55, 217-221. <https://doi.org/10.3989/graellsia.1999.v55.i0.330>
- León-Sanz, C.M., Collantes, F., Martínez-Ortega, E., 1998. Rectificación a la primera cita de flebotomos (Diptera, Psychodidae) en la Península Ibérica. *Graellsia* 54, 114. <https://doi.org/10.3989/graellsia.1998.v54.i0.349>
- Lewis, D.J., 1987. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from the Oriental region. *Syst. Entomol.* 12, 163-180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1987.tb00194.x>
- Lewis, D.J., 1974. The biology of Phlebotominae in relation to leishmaniasis. *Annu. Rev. Entomol.* 19, 363-384.
- Lewis, D.J., Dyce, A.L., 1988. Taxonomy of the Australasian Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with revision of genus *Sergentomyia* from the region. *Invertebr. Syst.* 2, 755-804. <https://doi.org/10.1071/IT9880755>
- Lewis, D.J., Young, D.G., Fairchild, G.B., Minter, D.M., 1977. Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Syst. Entomol.* 2, 319-332. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1977.tb00381.x>
- Lisi, O., D'Urso, V., Vaccalluzzo, V., Bongiorno, G., Khoury, C., Severini, F., Di Muccio, T., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 2014. Persistence of phlebotomine *Leishmania* vectors in urban sites of Catania (Sicily, Italy). *Parasit. Vectors* 7. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0560-0>
- López-Vélez, R., Moreno, R.M., 2005. Cambio climático en España y riesgo de enfermedades infecciosas y parasitarias transmitidas por artrópodos y roedores. *Rev. Esp. Salud Publica* 79, 177-190. <https://doi.org/10.1590/S1135-57272005000200006>
- Losada-Barragán, M., Cavalcanti, A., Umaña-Pérez, A., Porrozzi, R., Cuervo-Escobar, S., Vallejo, A.F., Sánchez-Gómez, M., Cuervo, P., 2016. Detection and quantification of *Leishmania infantum* in naturally and experimentally infected animal samples. *Vet. Parasitol.* 226, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.022>
- Lucientes-Curdi, J. 1986. Contribución al conocimiento epidemiológico de la leishmaniosis visceral canina en Zaragoza: estudio biológico y ecológico de las poblaciones de los flebotomos vectores (Tesis Doctoral). Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
- Lucientes-Curdi, J., Benito de Martín, M.I., Castillo-Hernández, J.A., Orcajo-Teresa, J., 1991. Seasonal dynamics of *Larroussius* species in Aragon (N.E. Spain). *Parassitologia* 33, 381-386.
- Lucientes-Curdi, J., Sánchez-Acedo, C., Castillo-Hernández, J.A., Estrada-Peña, A., 1988. Sobre la infección natural por *Leishmania* en *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, y *Phlebotomus ariasi*, Tonnoir, 1921, en el foco de leishmaniosis de Zaragoza. *Rev. Ibérica Parasitol.* 48, 7-8.

- Lucientes, J., 1999. Laboratory observations on the protection of dogs from the bites of *Phlebotomus perniciosus* with Scalibor(r) Protector, en: Killick-Kendrick, R. (Ed.), Canine leishmaniasis: An update. Barcelona, pp. 92-94.
- Lucientes, J., Blasco-Zumeta, J., Zárate, J.J., Arbea, J.I., Latorre, E., 2001. Primeros registros De insectos del género *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae) para los Monegros (Zaragoza, España). Bol. Soc. Entomol. Aragon. 28, 123-124.
- Lucientes, J., Osacar, J., Calvete, C., Benito, I., Castillo, J., 1994. Sobre la presencia de *Phlebotomus* (Larroussius) *langeroni* Nitzulescu, 1930,(Diptera: Psychodidae) en Aragón. Zapateri Revta. Aragon. ent. 4, 19-22.
- Lukes, J., Guilbride, D.L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R., Englund, P.T., Voty, J., Zíkova, A., 2002. Kinetoplast DNA network : Evolution of an improbable structure. Eukaryot. Cell 1, 495-502. <https://doi.org/10.1128/EC.1.4.495>
- Luyo-Acero, G.E., Uezato, H., Oshiro, M., Takei, K., Kariya, K., Katakura, K., Gómez-Landires, E., Hashiguchi, Y., Nonaka, S., 2004. Sequence variation of the cytochrome *b* gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. Parasitology 128, 483-491. <https://doi.org/10.1017/S0031182004004792>
- Magill, A., Grogl, M., Johnson, S., Gasser, R.J., 1994. Visceral infection due to *Leishmania tropica* in a veteran of operation Desert Storm who presented 2 years after leaving Saudi Arabia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 69, 522. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(75\)90115-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(75)90115-7)
- Maia, C., Afonso, M.O., Neto, L., Dionísio, L., Campino, L., 2009. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. J. Vector Borne Dis. 46, 268-272.
- Maia, C., Cardoso, L., 2015. Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. Vet. Parasitol. 213, 2-11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.003>
- Maia, C., Dantas-Torres, F., Campino, L., 2018. Parasite biology: the reservoir hosts. En: The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases por Bruschi, F. y Gradoni, L. Ed: Springer, Switzerland. ISBN 978-3-319-72385-3. pp.79-106. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>
- Maia, C., Depaquit, J., 2016. Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? Parasite 23, 55. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016062>
- Maia, C., Dionísio, L., Afonso, M.O., Neto, L., Cristóvão, J.M., Campino, L., 2013. *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European area, the Algarve Region in Portugal. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108, 481-487. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108042013014>
- Maia, C., Nunes, M., Campino, L., 2008. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. Vector-Borne Zoonotic Dis. 8, 555-559. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0247>
- Maia, C., Parreira, R., Cristóvão, J.M., Freitas, F.B., Afonso, M.O., Campino, L., 2015. Molecular detection of *Leishmania* DNA and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Portugal. Parasit. Vectors 8, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0787-4>
- Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., Bastos, F., Martins, Â., Pinto, P., Nunes, M., Vieira, M.L., Cardoso, L., Campino, L., 2014. Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal. Parasit. Vectors 7, 1-8.

Bibliografía

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-115>

- Majori, G., Maroli, M., Sabatinelli, G., Fausto, A.M., 1989. Efficacy of permethrin-impregnated curtains against endophilic phlebotomine sandflies in Burkina Faso. *Med. Vet. Entomol.* 3, 441-444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1989.tb00253.x>
- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J., Mohtarami, F., 2009. Blood meal identification in field-captured sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA assays. *Iran. J. Arthropod. Borne. Dis.* 3, 8-18.
- Manica, M., Guzzetta, G., Poletti, P., Filipponi, F., Solimini, A., Caputo, B., della Torre, A., Rosà, R., Merler, S., 2017. Transmission dynamics of the ongoing chikungunya outbreak in Central Italy: From coastal areas to the metropolitan city of Rome, summer 2017. *Eurosurveillance* 22, 18-41. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.44.17-00685>
- Marcelino, A.P., Ferreira, E.C., Avendanha, J.S., Costa, C.F., Chiarelli, D., Almeida, G., Moreira, É.C., Leite, R.C., dos Reis, J.K.P., Gontijo, C.M.F., 2011. Molecular detection of *Leishmania braziliensis* in *Rattus norvegicus* in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* 183, 54-58. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.06.019>
- Marco, J.D., Barroso, P.A., Locatelli, F.M., Cajal, S.P., Hoyos, C.L., Nevot, M.C., Lauthier, J.J., Tomasini, N., Juárez, M., Estévez, J.O., Korenaga, M., Nasser, J.R., Hashiguchi, Y., Ruybal, P., 2015. Multilocus sequence typing approach for a broader range of species of *Leishmania* genus: Describing parasite diversity in Argentina. *Infect. Genet. Evol.* 30, 308-317. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.031>
- Marín-Iniesta, F., Marín-Iniesta, E., Martín-Luengo, F., 1982. Papel de perros y zorros como reservorio de leishmaniosis en la región murciana. Resultados preliminares. *Rev. Ibér. Parasitol* 42, 307-313.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med. Vet. Entomol.* 27, 123-147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
- Maroli, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., Ready, P.D., Smith, D.F., Aquino, C., 1988. Natural infections of phlebotomine sandflies with Trypanosomatidae in central and south Italy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 227-228.
- Maroli, M., Gramiccia, M., Gradoni, L., 1987. Natural infection of *Phlebotomus perfliewi* with *Leishmania infantum* in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 596-598. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90420-2](https://doi.org/10.1016/0035-9203(87)90420-2)
- Maroli, M., Pennisi, M.G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., Gramiccia, M., 2007. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 145, 357-360. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.009>
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Gradoni, L., 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: Evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Int. Heal.* 13, 256-264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01998.x>
- Martín-Martín, I., Molina, R., Rohoušová, I., Drahoš, J., Volf, P., Jiménez, M., 2014. High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniosis focus in Madrid, Spain. *Vet. Parasitol.* 202, 207-216. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.045>

- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., Morillas-Márquez, F., 2007. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitol.* 145, 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.005>
- Martín-Sánchez, J., Gállego, M., Barón, S., Castillejo, S., Morillas-Márquez, F., 2006. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100, 527-532. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.08.005>
- Martín-Sánchez, J., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ludovisi, A., Morillas-Márquez, F., 2004. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 228-232. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)00060-9)
- Martín-Sánchez, J., Gramiccia, M., Pesson, B., Morillas-Márquez, F., 2000. Genetic polymorphism in sympatric species of the genus *Phlebotomus*, with special reference to *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (Diptera, Phlebotomidae). *Parasite* 7, 247-254. <https://doi.org/10.1051/parasite/2000074247>
- Martín-Sánchez, J., Guilvard, E., Acedo-Sánchez, C., Wolf Echeverri, M., Sanchís-Marín, M.C., Morillas-Márquez, F., 1994. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (Southern Spain). *Int. J. Parasitol.* 24, 405-408. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)90089-2](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)90089-2)
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V., Morillas-Márquez, F., 2009. Canine leishmaniasis in Southeastern Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 795-798. <https://doi.org/10.3201/eid1505.080969>
- Martín-Sánchez, J., Morillas-Márquez, F., Sanchís-Marín, M.C., Acedo-Sánchez, C. 1992. Infección natural de *Phlebotomus perniciosus* por dos zimodemas distintos del complejo *Leishmania infantum* en el Sudeste de España. *Bol. Soc. Port. Entomol.*, 1 Supl 3: 513-520.
- Martínez-Ortega, E., 1985. Los flebotomos ibéricos (Diptera: Psychodidae). I. Almería. *An. Biol.* 3, 107-111.
- Martínez-Ortega, E., Conesa-Gallego, E., 1987a. Caracteres morfológicos de interés taxonómico de los flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la Península Ibérica. *An. Biol.* 11, 43-53.
- Martínez-Ortega, E., Conesa-Gallego, E., 1987b. Fenología de los flebotomos del subgénero *Larroussius* (Diptera: Psychodidae, *Phlebotomus*) en el sureste de la Península Ibérica. *Bol. Asoc. Esp. Entomol.*, 11:293-300.
- Martínez-Ortega, E., Conesa-Gallego, E., Romera-Lozano, H., 1996. *Phlebotomus* (Larroussius) *langeroni* Nitzulescu, 1930 (Diptera, Psychodidae), espèce nouvelle pour l'Espagne. *Parasite* 3, 77-80.
- Maslov, D.A., Votýpka, J., Yurchenko, V., Lukeš, J., 2013. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: All that is hidden shall be revealed. *Trends Parasitol.* 29, 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.11.001>
- Mathis, A., Depaquit, J., Dvořák, V., Tuten, H., Bañuls, A.-L., Halada, P., Zapata, S., Lehrter, V., Hlavačková, K., Prudhomme, J., Volf, P., Sereno, D., Kaufmann, C., Pflüger, V., Schaffner, F., 2015. Identification of phlebotomine sand flies using one MALDI-TOF MS reference database and two mass spectrometer systems. *Parasit. Vectors* 8, 266. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0878-2>
- Mauricio, I.L., 2018. Leishmaniasis taxonomy. En: *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical*

Bibliografía

- Diseases por Bruschi, F. y Gradoni, L. Ed: Springer, Switzerland. ISBN 978-3-319-72385-3. pp 15-30. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>
- Mauricio, I.L., Yeo, M., Baghaei, M., Doto, D., Pratlong, F., Zemanova, E., Dedet, J.P., Lukes, J., Miles, M.A., 2006. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: Resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int. J. Parasitol.* 36, 757-769. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.006>
- McCombie-Young, T., Brendish, G., 1926. Sand flies and sand fly fever in the Peshawar district. *Indian J. Med. Res.* 13, 961-1021.
- McMahon-Pratt, D., Modi, G.B., Tesht, A.B., 1983. Detection of promastigote antigens on *Leishmania mexicana amazonensis* developing in the midgut of *Lutzomyia longipalpis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1268-1271. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1983.32.1268>
- Medlock, J.M., Leach, S.A., 2015. Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK. *Lancet Infect. Dis.* 15, 721-730. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)70091-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)70091-5)
- Meinecke, C.K., Schottelius, J., Oskam, L., Fleischer, B., 1999. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics* 104, e65-e65. <https://doi.org/10.1542/peds.104.5.e65>
- Melo-Ferreira, J., Boursot, P., Carneiro, M., Esteves, P.J., Farelo, L., Alves, P.C., 2012. Recurrent introgression of mitochondrial DNA among hares (*Lepus* spp.) revealed by species-tree inference and coalescent simulations. *Syst. Biol.* 61, 367-381. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr114>
- Memorias de Fuenlabrada. <http://memoriasfuenlabrada.blogspot.com/>
- Merino-Espinosa, G., Corpas-López, V., Morillas-Márquez, F., Díaz-Sáez, V., Martín-Sánchez, J., 2016. Genetic variability and infective ability of the rabbit trypanosome, *Trypanosoma nabiasi* Railliet 1895, in southern Spain. *Infect. Genet. Evol.* 45, 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.028>
- Mhaidi, I., El Kacem, S., Ait Kbaich, M., El Hamouchi, A., Sarih, M., Akarid, K., Lemrani, M., 2018. Molecular identification of *Leishmania* infection in the most relevant sand fly species and in patient skin samples from a cutaneous leishmaniasis focus, in Morocco. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006315>
- Michael, E., Ramaiah, K.D., Hoti, S.L., Barker, G., Paul, M.R., Yuvaraj, J., Das, P.K., Grenfell, B.T., Bundy, D.A.P., 2001. Quantifying mosquito biting patterns on humans by DNA fingerprinting of bloodmeals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 722-728. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.722>
- Michalsky, É.M., Rocha, M.F., da Rocha Lima, A.C.V.M., França-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, Á.J., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2007. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet. Parasitol.* 147, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.004>
- Miles, M.A., Lainson, R., Shawl, J.J., Voa, M.I., Souza, A.A.D.E., 1981. Leishmaniasis in Brazil: XV. Biochemical distinction of *Leishmania mexicana amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis* and *L. braziliensis* agents of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Basin of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 524-529.
- Millán, J., 2018. Molecular investigation of vector-borne parasites in wild micromammals ,

- Barcelona (Spain). Parasitol. Res. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5971-y>
- Millán, J., Ferroglio, E., Solano-Gallego, L., 2014. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. Parasitol. Res. 113, 2005-2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3929-2>
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglio, E., 2011. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic Island of Mallorca (Spain). Transbound. Emerg. Dis. 58, 352-357. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01212.x>
- Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad, 2015. Boletín oficial del estado. Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo. 24012-24015.
- Miró, G., Checa, R., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., Gálvez, R., 2012. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. Parasit. Vectors 5, 60. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-60>
- Miró, G., Molina, R., 2006. Leishmaniosis canina : manejo clínico y situación actual en España. Bayer, Madrid.
- Miró, G., Montoya, A., Roura, X., Gálvez, R., Sainz, A., 2013. Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: A multicentre study. Parasit. Vectors 6, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-117>
- Miró, G., Müller, A., Montoya, A., Checa, R., Marino, V., Marino, E., Fúster, F., Escacena, C., Descalzo, M.A., Gálvez, R., 2017. Epidemiological role of dogs since the human leishmaniosis outbreak in Madrid. Parasit. Vectors 10, 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2147-z>
- Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., Hernández, L., García, M., Canorea, I., Marino, V., Montoya, A., 2014. Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): Implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? Parasit. Vectors 7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-112>
- Miró, G., Troyano, A., Montoya, A., Fariñas, F., Fermín, M.L., Flores, L., Rojo, C., Checa, R., Gálvez, R., Marino, V., Fragío, C., Martínez-Nevado, E., 2018. First report of *Leishmania infantum* infection in the endangered orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Madrid , Spain. Parasit. Vectors 11, 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2772-1>
- Molina, R., 1991. Laboratory adaption of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911. Res. Rev. Parasitol. 51, 87-89.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., Alvar, J., 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, 491-493. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90446-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90446-4)
- Molina, R., Gradoni, L., Alvar, J., 2003. HIV and the transmission of *Leishmania*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 97, 29-45. <https://doi.org/10.1179/000349803225002516>
- Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. Vet. Parasitol. 190, 268-271. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.006>
- Molina, R., Lohse, J.M., Pulido, F., Laguna, F., López-Vélez, R., Alvar, J., 1999. Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus.

Bibliografía

- Am. J. Trop. Med. Hyg. 60, 51-3. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.51>
- Molyneux, D.H., 1970. Developmental patterns of trypanosomes of the genus *Herpetosoma*. Ann. Soc. belge Méd. Trop. 50, 229-238.
- Montalvo, A.M., Fraga, J., Maes, I., Dujardin, J., 2012. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 31, 1453-1461. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1463-z>
- Montalvo, A.M., Fraga, J., Monzote, L., Montano, I., De Doncker, S., Dujardin, J.C., Van Der Auwera, G., 2010. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: A universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. Parasitology 137, 1159-1168. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000089>
- Montoya, A., de Quadros, L.P., Mateo, M., Hernández, L., Gálvez, R., Alcántara, G., Checa, R., Jiménez, M.Á., Chicharro, C., Cruz, I., Miró, G., 2016. *Leishmania infantum* infection in Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus rufogriseus*) in a Spanish wildlife park. J. Zoo. Wildl. Med. 47, 586-593. <https://doi.org/10.1638/2014-0216.1>
- Montoya, A., García, M., Gálvez, R., Checa, R., Marino, V., Sarquis, J., Barrera, J.P., Rupérez, C., Caballero, L., Chicharro, C., Cruz, I., Miró, G., 2018. Implications of zoonotic and vector-borne parasites to free-roaming cats in central Spain. Vet. Parasitol. 251, 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.009>
- Moraes, C.S., Aguiar-Martins, K., Costa, S.G., Bates, P.A., Dillon, R.J., Genta, F.A., 2018. Second blood meal by female *Lutzomyia longipalpis*: Enhancement by oviposition and its effects on digestion, longevity, and *Leishmania* infection. Biomed Res. Int. 2018, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/2472508>
- Moreno, I., Álvarez, J., García, N., de la Fuente, S., Martínez, I., Marino, E., Toraño, A., Goyache, J., Vilas, F., Domínguez, L., Domínguez, M., 2014. Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. Vet. Parasitol. 199, 264-267. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.010>
- Morillas, F., Sánchez-Rabasco, F., Ocaña, J., Martín-Sánchez, J., Ocaña-Wihelmi, J., Acedo, C., Sanchís-Marín, M.C., 1996. Leishmaniasis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: A survey of the human, dog, and vector. Parasitol. Int. 82, 569-570.
- Morillas-Márquez, F., 2010. Current status of leishmaniasis in Granada (southern Spain) after 25 years of study. ARS Pharm. 51, 85-99.
- Morillas-Márquez, F., Castillo-Remiro, A., 1984. Nuevos datos sobre *Phlebotomus fortunatarum* (Úbeda Ontiveros y cols., 1982) y presencia de *Sergentomyia fallax* (Parrot, 1921) (Diptera, Phlebotomidae) en el archipiélago canario. Rev. Ibérica Parasitol. 44, 29-38.
- Morillas-Márquez, F., Díaz-Sáez, V., Morillas-Mancilla, M.J., Corpas-López, V., Merino-Espinosa, G., Gijón-Robles, P., Martín-Sánchez, J., 2017. Phlebotomine sandflies (Diptera, Phlebotomidae) of Lanzarote Island (Canary Islands, Spain): Ecological survey and evaluation of the risk of *Leishmania* transmission. Acta Trop. 168, 16-20. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.033>
- Morillas-Márquez, F., Guevara-Benítez, D.C., Úbeda-Ontiveros, J.M., González-Castro, J., 1983. Fluctuations annuelles des populations de Phlébotomes (Diptera, Phlebotomidae) dans la province de Grenade (Espagne). Ann Parasitol Hum Comp 58, 625-632.

- <https://doi.org/10.1051/parasite/1983586625>
- Morillas-Márquez, F., Sanchís-Marín, M.C., Martín-Sánchez, J., Acedo-Sánchez, C., 1991. On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the province of Almería in southeastern Spain. *Parassitologia* 33, 437-444.
- Morillas-Márquez, F., Úbeda-Ontiveros, J.M., 1985. Sobre algunos flebotomos de Galicia (España). *Rev. Ibérica Parasitol.* 45, 181-182.
- Morrison, A.C., Ferro, C., Tesh, R.B., 1993. Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 68-75. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.49.68>
- Mottram, J.C., Frame, M.J., Brooks, D.R., Tetley, L., Hutchison, J.E., Souza, A.E., Coombs, G.H., 1997. The multiple *cpb* cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *J. Biol. Chem.* 272, 14285-14293. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.14285>
- Mouri, O., Morizot, G., Van der Auwera, G., Ravel, C., Passet, M., Chartrel, N., Joly, I., Thellier, M., Jauréguiberry, S., Caumes, E., Mazier, D., Marinach-Patrice, C., Buffet, P., 2014. Easy identification of *Leishmania* species by mass spectrometry. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002841>
- Mukherjee, S., Hassan, M.Q., Ghosh, A., Ghosh, K.N., Bhattacharya, A., Adhya, S., 1997. Short report: *Leishmania* DNA in *Phlebotomus* and *Sergentomyia* species during a kala-azar epidemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 423-425. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.57.423>
- Mukhtar, M.M., Abdalla, H.S., Saff, S.H. El, Harith, A.E., 2000. Detection of antibodies to *Leishmania* region in eastern Sudan: A preliminary donovani in report animals in a kala-azar endemic. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 33-36. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90429-2](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90429-2)
- Müller, G.C., Kravchenko, V.D., Schlein, Y., 2008. Decline of *Anopheles sergentii* and *Aedes caspius* populations following presentation of attractive toxic (Spinosad) sugar bait stations in an oasis. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 24, 147-149. [https://doi.org/10.2987/8756-971X\(2008\)24\[147:DOASAA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971X(2008)24[147:DOASAA]2.0.CO;2)
- Müller, G.C., Schlein, Y., 2011. Different methods of using attractive sugar baits (ATSB) for the control of *Phlebotomus papatasi*. *J. Vector Ecol.* 36, S64-S70. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00113.x>
- Muniesa, A., Peris, A., Castillo, J.A., de Blas, I., 2016. Variations in seroprevalences of canine leishmaniasis: Could it be a consequence of the population structure? *Vet. Parasitol.* 226, 5-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.018>
- Muñoz, C., Risueño, J., Yilmaz, A., Pérez-Cutillas, P., Goyena, E., Ortuño, M., Bernal, L.J., Ortiz, J., Alten, B., Berriatua, E., 2017. Investigations of *Phlebotomus perniciosus* sand flies in rural Spain reveal strongly aggregated and gender-specific spatial distributions and advocate use of light-attraction traps. *Med. Vet. Entomol.* 1-11. <https://doi.org/10.1111/mve.12275>
- Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrino, J., Parejo, J.C., Serrano, F.J., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez-Nieto, L.C., 2013. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: Application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Trop.* 128, 706-709. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.009>

Bibliografía

- Mutinga, M.J., Massamba, N.N., Basimike, M., Kamau, C.C., Amimo, F.A., Onyido, A.E., Omogo, D.M., Kyai, F.M., Wachira, D.W., 1994. Cutaneous leishmaniasis in Kenya: *Sergentomyia garhami* (Diptera Psychodidae), a possible vector of *Leishmania major* in Kitui district: a new focus of the disease. East Afr. Med. J. 71, 424-428.
- Myskova, J., Svobodova, M., Beverley, S.M., Volf, P., 2007. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. Microbes Infect. 9, 317-324. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.12.010>
- Myskova, J., Votypka, J., Volf, P., Myšková, J., Votýpka, J., Volf, P., 2008. *Leishmania* in sand flies: comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. J. Med. Entomol. 45, 133-138. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[133:LISFCO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[133:LISFCO]2.0.CO;2)
- Nájera Angulo, L., 1944. Hallazgo de *Phlebotomus* en Galicia y consideraciones sobre la epidemiología de las leishmaniasis. Bol. Real Soc. Esp. Hist. Nat. 25-30.
- Nascimento, E.L.T., Martins, D.R., Monteiro, G.R., Barbosa, J.D., Ximenes, M.F.F.M., Maciel, B.L., Duarte, I., Jerônimo, S.M.B., 2008. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. Cad. saude publica / Minist. da Saude, Fund. Oswaldo Cruz, Esc. Nac. Saude Publica 24, 2964-2967. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200028>
- Nath-Chowdhury, M., Sangaralingam, M., Bastien, P., Ravel, C., Pratlong, F., Méndez, J., Libman, M., Ndao, M., 2016. Real-time PCR using FRET technology for Old World cutaneous leishmaniasis species differentiation. Parasit. Vectors 9, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1531-4>
- Navea-Pérez, H.M., Díaz-Sáez, V., Corpas-López, V., Merino-Espinosa, G., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., 2015. *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts? Parasitol. Res. 114, 2363-2370. doi:10.1007/s00436-015-4434-y
- Naucke, T.J., Amelung, S., Lorentz, S., 2016. First report of transmission of canine leishmaniasis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. Parasit. Vectors 9, 1-4. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1551-0>
- Neal, A.T., Ross, M.S., Schall, J.J., Vardo-Zalik, A.M., 2016. Genetic differentiation over a small spatial scale of the sand fly *Lutzomyia vexator* (Diptera: Psychodidae). Parasit. Vectors 9, 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1826-5>
- Negev, M., Paz, S., Clermont, A., Pri-Or, N.G., Shalom, U., Yeger, T., Green, M.S., 2015. Impacts of climate change on vector borne diseases in the Mediterranean Basin — implications for preparedness and adaptation policy. Int. J. Environ. Res. Public Health 12, 6745-6770. <https://doi.org/10.3390/ijerph120606745>
- Niare, S., Berenger, J.M., Dieme, C., Doumbo, O., Raoult, D., Parola, P., Almeras, L., 2016. Identification of blood meal sources in the main African malaria mosquito vector by MALDI-TOF MS. Malar. J. 15, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1152-6>
- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T., 2002. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. J. Clin. Microbiol. 40, 1666-1669. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.5.1666>
- Noyes, H.A., Reyburn, H., Bailey, J.W., Smith, D., 1998. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. J. Clin.

- Microbiol. 36, 2877-2881.
- Noyes, H.A., Stevens, J.R., Teixeira, M., Phelan, J., Holz, P., 1999. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *Int. J. Parasitol.* 29, 331-339. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00167-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00167-2)
- Ntais, P., Christodoulou, V., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Dedet, J.P., Pratlong, F., Antoniou, M., 2014. Will the introduction of *Leishmania tropica* MON-58, in the island of Crete, lead to the settlement and spread of this rare zymodeme? *Acta Trop.* 132, 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.01.003>
- Nzelu, C.O., Kato, H., Pupilampu, N., Desewu, K., Odoom, S., Wilson, M.D., Sakurai, T., Katakura, K., Boakye, D.A., 2014. First detection of *Leishmania tropica* DNA and *Trypanosoma* species in *Sergentomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) from an outbreak area of cutaneous leishmaniasis in Ghana. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2630. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002630>
- Obwaller, A.G., Köhler, M., Poepl, W., Herkner, H., Mooseder, G., Aspöck, H., Walochnik, J., 2018. *Leishmania* infections in Austrian soldiers returning from military missions abroad: a cross-sectional study. *Clin. Microbiol. Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.006>
- Ogden, N.H., 2017. Climate change and vector-borne diseases of public health significance. *FEMS Microbiol. Lett.* 364, 1-8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx186>
- Ogden, N.H., Lindsay, L.R., 2016. Effects of climate and climate change on vectors and vector-borne diseases: Ticks are different. *Trends Parasitol.* 32, 646-656. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.015>
- Okwor, I., Uzonna, J., 2016. Social and economic burden of human leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 489-493. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0408>
- Oleaga, A., Vicente, J., Ferroglio, E., Pegoraro de Macedo, M.R., Casais, R., del Cerro, A., Espí, A., García, E.J., Gortázar, C., 2015. Concomitance and interactions of pathogens in the Iberian wolf (*Canis lupus*). *Res. Vet. Sci.* 101, 22-27. doi:10.1016/j.rvsc.2015.05.010
- Oleaga, A., Zanet, S., Espí, A., Pegoraro de Macedo, M.R., Gortázar, C., Ferroglio, E., 2018. *Leishmania* in wolves in northern Spain: A spreading zoonosis evidenced by wildlife sanitary surveillance. *Vet. Parasitol.* 255, 26-31. doi:10.1016/j.vetpar.2018.03.015
- Oliveira, S.M., Afonso, R.C., Dias, C.M.G., Brazil, R.P., 1994. Description of a new species of sand fly *Lutzomyia* (Pressatia) *mamedei* n. sp.(Diptera: Psychodidae) from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 319. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761994000300006>
- OMS, 2010. Control de las leishmaniasis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el control de las Leishmaniasis. Serie de informes técnicos 949. Ginebra.
- OMS, 2002. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 44, 365-372.
- OPS, 2009. Manual para el estudio e identificación de vectores de leishmaniasis. Organización Panamericana de la Salud. Curso Latinoamericano de estudio e identificación de vectores de leishmaniasis, Medellín, Colombia, 13 a 24 de abril de 2009.
- Ordobás, M., Arce, A., Estirado, A., Moratilla, L., García, N., Pérez A.M., Gil, E., Velasco, M.J. Aránguez, E., 2017. Situación de la leishmaniasis en la Comunidad de Madrid. En: In: Brote

Bibliografía

- de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. Papel de las liebres y los conejos como reservorios. Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, España. ISBN: 978-84-541-3625-6, pp.99-104
- Ortega, M.V., Moreno, I., Domínguez, M., de la Cruz, M.L., Martín, A.B., Rodríguez-Bertos, A., López, R., Navarro, A., González, S., Mazariegos, M., Goyache, J., Domínguez, L., García, N., 2017. Application of a specific quantitative real-time PCR (qPCR) to identify *Leishmania infantum* DNA in spleen, skin and hair samples of wild Leporidae. Vet. Parasitol. 243, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.015>
- Oshaghi, M.A., Chavshin, A.R., Vatandoost, H., 2006. Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers. Exp. Parasitol. 114, 259-264. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.04.001>
- Oshaghi, M.A., Rasolian, M., Shirzadi, M.R., Mohtarami, F., Doosti, S., 2010. First report on isolation of *Leishmania tropica* from sandflies of a classical urban cutaneous leishmaniasis focus in southern Iran. Exp. Parasitol. 126, 445-450. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.05.020>
- Oshaghi, M.A., Ravasan, N.M., Javadian, E.A., Mohebbi, M., Hajjarian, H., Zare, Z., Mohtarami, F., Rassi, Y., 2009. Vector incrimination of sand flies in the most important visceral leishmaniasis focus in Iran. Am. J. Trop. Med. Hyg. 81, 572-577. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.08-0469>
- Özbel, Y., Karakuş, M., Arserim, S.K., Kalkan, Ş.O., Töz, S., 2016. Molecular detection and identification of *Leishmania* spp. in naturally infected *Phlebotomus tobbi* and *Sergentomyia dentata* in a focus of human and canine leishmaniasis in western Turkey. Acta Trop. 155, 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.018>
- Özkeklikçi, A., Karakuş, M., Özbel, Y., Töz, S., 2017. The new situation of cutaneous leishmaniasis after Syrian civil war in Gaziantep city, southeastern region of Turkey. Acta Trop. 166, 35-38. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.10.019>
- Pablos, M.J., Pintor, G., Marco, M.E., 2017. La intervención municipal. En: Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. Papel de las liebres y los conejos como reservorios. Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, España. ISBN: 978-84-541-3625-6, pp. 267-282.
- Parham, P.E., Waldock, J., Christophides, G.K., Hemming, D., Agosto, F., Evans, K.J., Fefferman, N., Gaff, H., Gumel, A., LaDeau, S., Lenhart, S., Mickens, R.E., Naumova, E.N., Ostfeld, R.S., Ready, P.D., Thomas, M.B., Velasco-Hernández, J., Michael, E., 2015. Climate, environmental and socio-economic change: weighing up the balance in vector-borne disease transmission. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 370, 20130551. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0551>
- Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T., Murby, J., 2000. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. Energy 54, 369-376. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00112-6](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00112-6)
- Parvizi, P., Mauricio, I., Aransay, A.M., Miles, M.A., Ready, P.D., 2005. First detection of *Leishmania major* in peridomestic *Phlebotomus papatasi* from Isfahan province, Iran: Comparison of nested PCR of nuclear ITS ribosomal DNA and semi-nested PCR of minicircle kinetoplast DNA. Acta Trop. 93, 75-83. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.007>
- Paşa, S., Tetik Vardarli, A., Erol, N., Karakuş, M., Töz, S., Atasoy, A., Balcioglu, I.C., Emek Tuna, G., Ermiş, Ö. V., Ertabaklar, H., Özbel, Y., 2015. Detection of *Leishmania major* and

- Leishmania tropica* in domestic cats in the Ege Region of Turkey. Vet. Parasitol. 212, 389-392. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.042>
- Paternina, L.E., Verbel-Vergara, D., Romero-Ricardo, L., Pérez-Doria, A., Paternina-Gómez, M., Martínez, L., Bejarano, E.E., 2016. Evidence for anthropophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of bloodmeals. Acta Trop. 153, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.005>
- Patz, J.A., Graczyk, T.K., Geller, N., Vittor, A.Y., 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. Int. J. Parasitol. 30, 1395-1405. [https://doi.org/S0020-7519\(00\)00141-7](https://doi.org/S0020-7519(00)00141-7) [pii]
- Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M.-A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabbinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S.L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D.P., Oyola, S.O., Hilley, J.D., Brito, L.O., Tosi, L.R.O., Barrell, B., Cruz, A.K., Mottram, J.C., Smith, D.F., Berriman, M., 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nat. Genet. 39, 839-47. <https://doi.org/10.1038/ng2053>
- Pereira, A.A.S., De Castro Ferreira, E., Da Rocha Lima, A.C.V.M., Tonelli, G.B., Rêgo, F.D., Paglia, A.P., Andrade-Filho, J.D., Paz, G.F., Gontijo, C.M.F., 2017. Detection of *Leishmania* spp. in silvatic mammals and isolation of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* from *Rattus rattus* in an endemic area for leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. PLoS One 12, 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187704>
- Pereira, S., Pita-Pereira, D., Araujo-Pereira, T., Britto, C., Costa-Rego, T., Ferrolho, J., Vilhena, M., Rangel, E.F., Vilela, M.L., Afonso, M.O., 2017. First molecular detection of *Leishmania infantum* in *Sergentomyia minuta* (Diptera, Psychodidae) in Alentejo, southern Portugal. Acta Trop. 174, 45-48. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.020>
- Persichetti, M.F., Pennisi, M.G., Vullo, A., Masucci, M., Migliazzo, A., Solano-Gallego, L., 2018. Clinical evaluation of outdoor cats exposed to ectoparasites and associated risk for vector-borne infections in southern Italy. Parasit. Vectors 11, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2725-8>
- Pesson, B., Ready, J.S., Benabdennbi, I., Martín-Sánchez, J., Esseghir, S., Cadi-Soussi, M., Morillas-Márquez, F., Ready, P.D., 2004. Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: Mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. Med. Vet. Entomol. 18, 25-37. <https://doi.org/10.1111/j.0269-283x.2004.0471.x>
- Phumee, A., Tawatsin, A., Thavara, U., Pengsakul, T., Thammapalo, S., Depaquit, J., Gay, F., Siriya-satien, P., 2017. Detection of an unknown trypanosoma DNA in a *Phlebotomus stantoni* (Diptera: Psychodidae) collected from southern Thailand and records of new sand flies with reinstatement of *Sergentomyia hivernus* Raynal & Gaschen, 1935 (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 54, 429-434. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw161>
- Picado, A., Das, M.L., Kumar, V., Kesari, S., Dinesh, D.S., Roy, L., Rijal, S., Das, P., Rowland, M., Sundar, S., Coosemans, M., Boelaert, M., Davies, C.R., 2010. Effect of village-wide use of long-lasting insecticidal nets on visceral leishmaniasis vectors in India and Nepal: a cluster randomized trial. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, e587. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000587>
- Pigott, D.M., Bhatt, S., Golding, N., Duda, K.A., Battle, K.E., Brady, O.J., Messina, J.P., Balard, Y.,

Bibliografía

- Bastien, P., Pratlong, F., Brownstein, J.S., Fretfeild, C.C., Mekaru, S.R., Gehting, P.W., George, D.B., Myers, M.F., Reithinger, R., Hay, S.I., 2014. Global distribution maps of the Leishmaniasis. *Elife* 2014, 1-21. <https://doi.org/10.7554/eLife.02851>
- Pimenta, P.F., Saraiva, E.M., Rowton, E., Modi, G.B., Garraway, L.A., Beverley, S.M., Turco, S.J., Sacks, D.L., 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9155-9.
- Pimenta, P., Turco, S., McConville, M., Lawyer, P., Perkins, P., Sacks, D., 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* (80-). 256, 1812-1815. <https://doi.org/10.1126/science.1615326>
- Pires, C.A., 1984. Les phlébotomes du Portugal. I - Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir , 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead , 1911 , par *Leishmania* dans le foyer zoonotique de Arrabida (Portugal). *Ann. Parasitol. Hum. Comparée* 59, 521-524.
- Pita-Pereira, D., Lins, R., Oliveira, M.P., Lima, R.B., Pereira, B.A.S., Moreira, O.C., Brazil, R.P., Britto, C., 2012. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 5, 15. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-15>
- Portús, M., Gállego, M., Riera, C., Aisa, M.J., Fisa, R., Castillejo, S., 2002. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev. Ibérica Parasitol.* 62, 72-76.
- Pratlong, F., Dereure, J., Ravel, C., Lami, P., Balard, Y., Serres, G., Lanotte, G., Rioux, J.A., Dedet, J.P., 2009. Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. *Trop. Med. Int. Heal.* 14, 1071-1085. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02336.x>
- Pratlong, F., Lami, P., Ravel, C., Balard, Y., Dereure, J., Serres, G., Baidouri, F.E.L., Dedet, J.P., 2013. Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. *Parasitology* 140, 423-434. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001825>
- Pratlong, F., Rioux, J.A., Marty, P., Dereure, J., Dedet, J., 2004. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4077-4082. doi:10.1128/JCM.42.9.4077
- Pratt, D.M.M., David, J.R., 1981. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature* 291, 581-583. <https://doi.org/10.1038/291581a0>
- Prudhomme, J., Rahola, N., Toty, C., Cassan, C., Roiz, D., Vergnes, B., Thierry, M., Rioux, J.A., Alten, B., Sereno, D., Bañuls, A.L., 2015. Ecology and spatiotemporal dynamics of sandflies in the Mediterranean Languedoc region (Roquedur area, Gard, France). *Parasit. Vectors* 8, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1250-2>
- Purroy Irazoz, F.J., Varela, J.M., 2003. Guía de los mamíferos de España : península, Baleares y Canarias. Lynx Edicions. Barcelona
- Qualls, W.A., Müller, G.C., Khallaayoune, K., Revay, E.E., Zhioua, E., Kravchenko, V.D., Arheart, K.L., Xue, R.-D., Schlein, Y., Hausmann, A., Kline, D.L., Beier, J.C., 2015. Control of sand flies with attractive toxic sugar baits (ATSB) and potential impact on non-target organisms in

- Morocco. *Parasit. Vectors* 8, 87. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0671-2>
- Quaresma, P.F., Carvalho, G.M. de L., Ramos, M.C. das N.F., Filho, J.D.A., 2012. Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 480-485. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400007>
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915-1934. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991156>
- Quispe-Tintaya, K.W., Ying, X., Dedet, J., Rijal, S., De Bolle, X., Dujardin, J., 2004. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: Polymorphism of cysteine proteinase *b* and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. *J. Infect. Dis.* 189, 1035-1043. <https://doi.org/10.1086/382049>
- Ramírez, G.A., Peñafiel-Verdú, C., Altimira, J., García-González, B., Vilafranca, M., 2013. Naturally acquired visceral leishmaniasis in a captive Bennett's Wallaby (*Macropus rufogriseus rufogriseus*). *Vet. Pathol.* 50, 188-190. <https://doi.org/10.1177/0300985812446155>
- Ranasinghe, S., Rogers, M.E., Hamilton, J.G.C., Bates, P.A., Maingon, R.D.C., 2008. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 875-882. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.04.003>
- Ready, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 227-250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>
- Ready, P.D., 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveillance* 15, 29-39. <https://doi.org/10.2807/ese.15.10.19505-en>
- Ready, P.D., 2008. Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev. Sci. Tech.* 27, 399-412.
- Ready, P.D., 1979. Factors affecting egg production of laboratory-bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 16, 413-423. <https://doi.org/10.1093/jmedent/16.5.413>
- Reale, S., Torina, A., Sole, M., Calderone, S., Piazza, M., Lupo, T., Manna, L., Gravino, A.E., Currò, V., Vitale, F., 2008. Fluorescence-based detection of *Leishmania infantum* DNA in *Phlebotomus* vectors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 334-336. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.096>
- Reglero, M., Vicente, J., Rouco, C., Villafuerte, R., Gortázar, C., 2007. *Trypanosoma* spp. infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) during a restocking program in southern Spain. *Vet. Parasitol.* 149, 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.001>
- Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2013. Protocolos de enfermedades de declaración obligatoria. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III, Madrid.
- Reyburn, H., Rowland, M., Mohsen, M., Khan, B., Davies, C., 2003. The prolonged epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: «Bringing down the neighbourgood». *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97, 170-176. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)90111-8](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)90111-8)
- Ribolla, P.E.M., Gushi, L.T., Pires e Cruz, M.D.S., Costa, C.H.N., Costa, D.L., Lima Júnior, M.S.D.C., Dorval, M.E.M.C., Gutierrez De Oliveira, A., Da Cunha Santos, M.F., Fonseca Camargo-Neves, V.L., Fortaleza, C.M.C.B., Alonso, D.P., 2016. *Leishmania infantum* genetic

Bibliografía

- diversity and *Lutzomyia longipalpis* mitochondrial haplotypes in Brazil. Biomed Res. Int. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9249217>
- Rioux, J.-A., Carron, S., Dereure, J., Périères, J., Zeraia, L., Franquet, E., Babinot, M., Gállego, M., Prudhomme, J., 2013. Ecology of leishmaniasis in the South of France. 22. Reliability and representativeness of 12 *Phlebotomus ariasi*, *P. perniciosus* and *Sergentomyia minuta* (Diptera: Psychodidae) sampling stations in Vallespir (eastern French Pyrenees r. Parasite 20, 34. <https://doi.org/10.1051/parasite/2013035>
- Rioux, J.-A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Périères, J., 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 65, 111-125. <https://doi.org/10.1051/parasite/1990653111>
- Rioux, J., Croset, H., Aboulker, J., Papierok, B., 1972. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 4. Infestation d'une population naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Ann. Parasitol. 47, 325-330. <https://doi.org/10.1051/parasite/1972472325>
- Rioux, J., Golvan, H., Croset, R., Houin, R., Juminer, B., Bain, O., Tour, S., 1967. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 1.- Les phlébotomes. Echantillonnage-Ethologie. Ann. Parasitol. 42, 561-603. <https://doi.org/10.1051/parasite/1967426561>
- Rioux, J., Lanotte, G., Périères, J., Croset, H., 1973. Écologie des leishmanioses dans le sud de la France 6.- Première mention de l'infestation spontanée de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Ann. Parasitol. Hum. Comparée 48, 519-522. <https://doi.org/10.1051/parasite/1973484519>
- Rioux, J.A., Guilvard, E., Gállego, J., Moreno, G., Pratlong, F., Portús, M., Rispail, P., M, G., Bastien, P., 1986. *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania infantum*, en: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. IMEEE, Montpellier, pp. 439-444.
- Rioux, J.A., Jarry, D., Lanotte, G., Maazoun, R., Killick-Kendrick, R., 1984. Leishmanioses dans le Sud de la France 18. Identification enzymatique de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, isolé de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 spontanément infesté en Cévennes. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 59, 331-333.
- Risueño, J., Muñoz, C., Pérez-Cutillas, P., Goyena, E., González, M., Ortuño, M., Bernal, L.J., Ortiz, J., Alten, B., Berriatua, E., 2017. Understanding *Phlebotomus perniciosus* abundance in south-east Spain: assessing the role of environmental and anthropic factors. Parasit. Vectors 10, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2135-3>
- Risueño, J., Ortuño, M., Pérez-Cutillas, P., Goyena, E., Maia, C., Cortes, S., Campino, L., Bernal, L.J., Muñoz, C., Arcenillas, I., Martínez-Rondán, F., González, M., Collantes, F., Ortiz, J., Martínez-Carrasco, C., Berriatua, E., 2018. Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in southeast Spain. Vet. Parasitol. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.05.012>
- Robert, L.L., Perich, M.J., Schlein, Y., Jacobson, J.L., 1998. *Bacillus sphaericus* inhibits hatching of phlebotomine sand fly eggs. J. Am. Mosq. Control Assoc. 14, 351-2.
- Rocchigiani, G., Ebani, V.V., Nardoni, S., Bertelloni, F., Bascherini, A., Leoni, A., Mancianti, F., Poli, A., 2018. Molecular survey on the occurrence of arthropod-borne pathogens in wild brown hares (*Lepus europaeus*) from Central Italy. Infect. Genet. Evol. 59, 142-147. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.02.005>

- Rocha, M.N., Margonari, C., Presot, I.M., Soares, R.P., 2010. Evaluation of 4 polymerase chain reaction protocols for cultured *Leishmania* spp. typing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 68, 401-409. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.007
- Rodrigues, A.C.M., Magalhães, R.D., Romcy, K.A.M., Freitas, J.L.S., Melo, A.C.F.L., Rodon, F.C.M., Bevilaqua, C.M.L., Melo, L.M., 2017. A new whole mitochondrial genome qPCR (WMG-qPCR) with SYBR Green® to identify phlebotomine sand fly blood meals. *Vet. Parasitol.* 238, 17-23. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.007
- Rodrigues, A.C.M., Melo, L.M., Magalhães, R.D., de Moraes, N.B., de Souza Júnior, A.D., Bevilaqua, C.M.L., 2016. Molecular identification of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) as a potential vector for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Vet. Parasitol.* 220, 28-32. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.018
- Rodríguez-Rodríguez, D., 2010. Bosque Sur : análisis de la restauración de un espacio degradado en el sur de la Comunidad de Madrid. CSIC - Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Rogers, M.E., Bates, P.A., 2007. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog.* 3, 0818-0825. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030091
- Rogers, M.E., Hajmová, M., Joshi, M.B., Sadlova, J., Dwyer, D.M., Volf, P., Bates, P.A., 2008. *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cell. Microbiol.* 10, 1363-1372. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01132.x
- Rogers, M.E., Ilg, T., Nikolaev, A. V., Ferguson, M.A.J., Bates, P.A., 2004. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430, 463-467. https://doi.org/10.1038/nature02675
- Rondani, C., 1843. Species italicae generis Hebotomi, Rndn, ex insectis dipteris: fragmentum septimum and inveniendam dipterologian italicam. *Annals Soc Ent Fr* 1, 263-267.
- Roque, A.L.R., Jansen, A.M., 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 3, 251-262. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004
- Rosário, I.N.G., De Andrade, A.J., Ligeiro, R., Ishak, R., Silva, I.M., Johnson, R., 2018. Evaluating the adaptation process of sandfly fauna to anthropized environments in a leishmaniasis transmission area in the Brazilian Amazon. *J. Med. Entomol.* 54, 450-459. https://doi.org/10.1093/jme/tjw182
- Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 2008. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop.* 105, 158-165. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.10.005
- Rosypal, A.C., Troy, G.C., Zajac, A.M., Frank, G., Lindsay, D.S., 2005. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected Beagle. *J. Parasitol.* 91, 970-972. https://doi.org/10.1645/GE-483R.1
- Rowland, M., Munir, A., Durrani, N., Noyes, H., Reyburn, H., 1999. An outbreak of cutaneous leishmaniasis in an Afghan refugee settlement in north-west Pakistan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 133-136. https://doi.org/10.1016/S0035-9203(99)90285-7

Bibliografía

- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D., Kirk, P.M., 2015. A higher level classification of all living organisms. PLoS One 10, 1-60. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>
- Rugna, G., Carra, E., Corpus, F., Calzolari, M., Salvatore, D., Bellini, R., Di Francesco, A., Franceschini, E., Bruno, A., Poglayen, G., Varani, S., Vitale, F., Merialdi, G., 2017. Distinct *Leishmania infantum* Strains Circulate in Humans and Dogs in the Emilia–Romagna Region, Northeastern Italy. Vector-Borne Zoonotic Dis. 17, 409-415. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2052>
- Ruiz-Fons, F., Ferroglio, E., Gortázar, C., 2013. *Leishmania infantum* in free-ranging hares, 2004-2010. Eurosurveillance 18, pii=20541. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20541>
- Sacks, D., Kamhawi, S., 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. Annu. Rev. Microbiol. 55, 453-483. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.453>
- Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Späth, G., Epstein, L., Turco, S.J., Beverley, S.M., 2000. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 406-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.406>
- Sacks, D.L., Perkins, P. V., 1985. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34, 456-459. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1985.34.456>
- Sacks, D.L., Perkins, P. V., 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science. 223, 1417-1419. <https://doi.org/10.1126/science.6701528>
- Sáez, V.D., Morillas-Márquez, F., Merino-Espinosa, G., Corpas-López, V., Morales-Yuste, M., Pesson, B., Barón-López, S., Lucientes-Curdi, J., Martín-Sánchez, J., 2018. *Phlebotomus langeroni* Nitzulescu (Diptera, Psychodidae) a new vector for *Leishmania infantum* in Europe. Parasitol. Res. 117, 1105-1113. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5788-8>
- Saghafipour, A., Vatandoost, H., Zahraei-Ramazani, A.R., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Rassi, Y., Jooshin, M.K., Shirzadi, M.R., Akhavan, A.A., 2017. Control of zoonotic cutaneous leishmaniasis vector, *Phlebotomus papatasi*, using attractive toxic sugar baits (ATSB). PLoS One 12, 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173558>
- Sales, K.G.D.S., Costa, P.L., De Morais, R.C.S., Otranto, D., Brandão-Filho, S.P., Cavalcanti, M.D.P., Dantas-Torres, F., 2015. Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. Parasit. Vectors 8, 4-9. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0840-3>
- Sánchez-García, L., Berzunza-Cruz, M., Becker-Fauser, I., Rebollar-Téllez, E.A., 2010. Sand flies naturally infected by *Leishmania* (L.) *mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, México. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 104, 406-411. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.01.010>
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Saraiva, L., Filho, J.D.A., de Oliveira Silva, S., De Andrade, A.S.R., Melo, M.N., 2010. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in southeastern Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105, 1033-1039. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000800013>

- Sarataphan, N., Vongpakorn, M., Nuansrichay, B., Autarkool, N., Keowkarnkah, T., Rodtian, P., Stich, R.W., Jittapalpong, S., 2007. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (Herpetosoma) infection in a sick infant from Thailand. J. Med. Microbiol. 56, 1118-1121. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47222-0>
- Sari, B., Limoncu, M.E., Balcioglu, I.C., Aldemir, A., Tasci, G.T., Kiliç, Y., Toz, S., Demirci, B., Demir, S., Kasap, O.E., Olgen, M.K., Ozbel, Y., 2015. Seroepidemiological and entomological survey in a new focus of zoonotic visceral leishmaniasis in Kars province, northeastern Turkey. Vet. Parasitol. 209, 179-187. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.021>
- Sastre, N., Francino, O., Ramírez, O., Enseñat, C., Sánchez, A., Altet, L., 2008. Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from southwestern Europe. Vet. Parasitol. 158, 117-120. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.08.008>
- Savani, E.S.M.M., de Almeida, M.F., de Oliveira Camargo, M.C.G., D'Auria, S.R.N., Silva, M.M.S., de Oliveira, M.L., Sacramento, D., 2010. Detection of *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis* and *Leishmania* (Leishmania) *infantum* chagasi in Brazilian bats. Vet. Parasitol. 168, 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.019>
- Schlein, Y., Borut, S., Jacobson, R.L., 1990. Oviposition diapause and other factors affecting the egg-laying of *Phlebotomus papatasi* in the laboratory. Med. Vet. Entomol. 4, 69-78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00262.x>
- Schlein, Y., Warburg, A., Schnur, L.F., Le Blancq, S.M., Gunders, A.E., 1984. Leishmaniasis in Israel: Reservoir hosts, sandfly vectors and leishmanial strains in the Negev, Central Arava and along the Dead Sea. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 78, 480-484. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(84\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(84)90067-1)
- Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma 109, 365-371. <https://doi.org/10.1007/s004120000089>
- Schönian, G., Kuhls, K., Mauricio, I.L., 2011. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. Parasitology 138, 405-425. <https://doi.org/10.1017/S0031182010001538>
- Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D.F.H., Presber, W., Jaffe, C.L., 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 47, 349-358. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00093-2)
- Schreck, C.E., Mount, G.A., Carlson, D.A., 1982. Wear and wash persistence of permethrin used as a clothing treatment for personal protection against the lone star tick (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 19, 143-146. <https://doi.org/10.1093/jmedent/19.2.143>
- Scott, T.W., Githeko, A.K., Fleisher, A., Harrington, L.C., Yan, G., 2006. DNA profiling of human blood in anophelines from lowland and highland sites in western Kenya. Am. J. Trop. Med. Hyg. 75, 231-7.
- Seblova, V., Sadlova, J., Vojtkova, B., Votypka, J., Carpenter, S., Bates, P.A., Volf, P., 2015. The biting midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) is capable of developing late stage infections of *Leishmania enriettii*. PLoS Negl. Trop. Dis. 9, 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004060>
- Senghor, M.W., Niang, A.A., Depaquit, J., Ferté, H., Faye, M.N., Elguero, E., Gaye, O., Alten, B., Perktas, U., Cassan, C., Faye, B., Bañuls, A.L., 2016. Transmission of *Leishmania infantum*

Bibliografia

- in the canine leishmaniasis focus of Mont-Rolland, Senegal: Ecological, parasitological and molecular evidence for a possible role of *Sergentomyia* sand flies. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004940>
- Serafim, T.D., Coutinho-Abreu, I. V., Oliveira, F., Meneses, C., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2018. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. Nat. Microbiol. 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0125-7>
- Shapiro, J.T., da Costa Lima Junior, M.S., Dorval, M.E.C., de Oliveira França, A., Cepa Matos, M. de F., Bordignon, M.O., 2013. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. Acta Trop. 128, 171-174. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.07.004>
- Sharara, S.L., Kanj, S.S., 2014. War and infectious diseases: Challenges of the Syrian Civil War. PLoS Pathog. 10, 2-5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004438>
- Sharma, U., Singh, S., 2008. Insect vectors of *Leishmania*: Distribution, physiology and their control. J. Vector Borne Dis. 45, 255-272. <https://doi.org/10.1201/9781420088489.ch8>
- Shaw, J., 2007. The leishmaniasis - Survival and expansion in a changing world. A mini-review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102, 541-546. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000500001>
- Shaw, J., Lainson, R., Ryan, L., Braga, R.R., McMahon-pratt, D., David, J.R., 1987. Leishmaniasis in Brazil: XXIII. The identification *Leishmania braziliensis braziliensis* in wild-caught neotropical sandflies using monoclonal antibodies. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81, 69-72. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90287-2](https://doi.org/10.1016/0035-9203(87)90287-2)
- Shaw, S.E., Langton, D.A., Hillman, T.J., 2009. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: A zoonotic disease waiting for a vector? Vet. Parasitol. 163, 281-285. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.025>
- Sherry, K., Miró, G., Trotta, M., Miranda, C., Montoya, A., Espinosa, C., Ribas, F., Furlanello, T., Solano-Gallego, L., 2011. A serological and molecular study of *Leishmania infantum* infection in cats from the Island of Ibiza (Spain). Vector-Borne Zoonotic Dis. 11, 239-245. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0251>
- Shortt, H.E., Smith, R.O.A., Swaminath, C.S., Khrisnan, K.V., 1931. Transmission of Indian kala-azar by the bite of *Phlebotomus argentipes*. Indian J. Med. Res. 18, 1373-1375.
- Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M.A., Xavier, M.N., Nascimento, E.F., Santos, R.L., 2009. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol. 160, 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.079>
- Silva, F.S., Brito, J.M., Costa Neta, B.M., Lobo, S.E.P.D., 2015. Evaluation of light-emitting diodes as attractant for sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in northeastern Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 110, 801-803. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150132>
- Simpson, L., Simpson, A.M., Kidane, G., Livingston, L., Spithill, T.W., 1980. The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29, 1053-1063. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.1053>
- Siripattanapipong, S., Leelayoova, S., Ninsaeng, U., Mungthin, M., 2018. Detection of DNA of *Leishmania siamensis* in *Sergentomyia* (Neophlebotomus) *iyengari* (Diptera: Psychodidae) and molecular identification of blood meals of sand flies in an affected area, southern Thailand. J. Med. Entomol. 20, 1-7. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy069>

- Soares, V.Y.R., da Silva, J.C., da Silva, K.R., Pires e Cruz, M. do S., Santos, M.P.D., Ribolla, P.E.M., Alonso, D.P., Coelho, L.F.L., Costa, D.L., Costa, C.H.N., 2014. Identification of blood meal sources of *Lutzomyia longipalpis* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the cytochrome *b* gene. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 379-383. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130405>
- Sobrinho, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millán, J., Revilla, M., Arnal, M.C., Trisciuglio, A., Gortázar, C., 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* 155, 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.003>
- Solano-Gallego, L., Fernández-Bellón, H., Serra, P., Gállego, M., Ramis, A., Fondevila, D., Ferrer, L., 2003. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equine Vet. J.* 35, 320-323.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit. Vectors* 4, 86. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M., Alberola, J., 2007. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 676-680.
- Souza-Castro, L., de Oliveira-França, A., de Castro-Ferreira, E., da Costa Lima Júnior, M.S., Gontijo, C.M.F., Pereira, A.A.S., Dorval, M.E.C., 2018. Characterization of *Leishmania* species from central-west Region of Brazil. *Parasitol. Res.* 1-7. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5871-1>
- Srinivasan, R., Panicker, K.N., 1992. Identification of bloodmeals of phlebotomine sandflies using the agarose gel diffusion method. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 23, 486-488.
- Stamm, L.V., 2015. Human migration and leishmaniasis—on the move. *JAMA Dermatology* 152, 1-2. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2015.4765>
- Steuber, S., Abdel-Rady, A., Clausen, P.H., 2005. PCR-RFLP analysis: A promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Parasitol. Res.* 97, 247-254. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1410-y>
- Stöver, B.C., Müller, K.F., 2010. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 11, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-7>
- Sturm, N.R., Simpson, L., 1991. *Leishmania tarentolae* minicircles of different sequence classes encode single guide RNAs located in the variable region approximately 150 bp from the conserved region. *Nucleic Acids Res.* 19, 6277-6281. <https://doi.org/10.1093/nar/19.22.6277>
- Suárez-Rodríguez, B., Isidoro-Fernández, B., Santos-Sanz, S., Sierra-Moros, M., Molina-Moreno, R., Astray-Mochales, J., Amela-Heras, C., 2012. Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain. *Rev Esp Salud Publica* 86, 555-64. <https://doi.org/10.4321/S1135-57272012000600002>
- Succo, T., Leparac Goffart, I., Ferré, J., Roiz, D., Broche, B., Maquart, M., Noel, H., Catelinois, O., Entezam, F., Caire, D., Jourdain, F., Esteve Moussion, I., Cochet, A., Paupy, C., Rousseau, C., Paty, M., Golliot, F., 2016. Autochthonous dengue outbreak in Nîmes, south of France, July to September 2015. *Eurosurveillance* 21, 1-7. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.21.30240>
- Sudia, W.D., Chamberlain, R.W., 1962. Battery-operated light trap, an improved model. *Mosq.*

Bibliografía

- News 22, 126-129.
- Sunter, J., Gull, K., 2017. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. Open Biol. 7, 170165. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
- Sutherst, R.W., 2004. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. Clin. Microbiol. Rev. 17, 136-173. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.136>
- Svobodová, M., Alten, B., Zídková, L., Dvořák, V., Hlavačková, J., Myšková, J., Šeblová, V., Kasap, O.E., Belen, A., Votýpka, J., Volf, P., 2009. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. Int. J. Parasitol. 39, 251-256. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.016>
- Svobodová, M., Rádrová, J., 2018. Phlebotomine sand flies - Potential vector of avian trypanosomes. Acta protozool., 57, 53-59. doi:10.4467/16890027AP.18.005.8399
- Svobodová, M., Votýpka, J., Peckova, J., Dvořák, V., Nasereddin, A., Baneth, G., Sztern, J., Kravchenko, V., Orr, A., Meir, D., Schnur, L.F., Volf, P., Warburg, A., 2006. Distinct transmission cycles of *Leishmania tropica* in 2 adjacent foci, northern Israel. Emerg. Infect. Dis. 12, 1860-1868. <https://doi.org/10.3201/eid1212.060497>
- Tabbabi, A., Bousslimi, N., Rhim, A., Aoun, K., Bouratbine, A., 2011. Short report: First report on natural infection of *Phlebotomus sergenti* with *Leishmania* promastigotes in the cutaneous leishmaniasis focus in southeastern Tunisia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 85, 646-647. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0681>
- Tabbabi, A., Rhim, A., Ghrab, J., Martin, O., Aoun, K., Bouratbine, A., Ready, P.D., 2014. *Phlebotomus* (Paraphlebotomus) *riouxi*: A synonym of *Phlebotomus chabaudi* without any proven vectorial role in Tunisia and Algeria. Med. Vet. Entomol. 28, 51-59. <https://doi.org/10.1111/mve.12067>
- Takken, W., Verhulst, N.O., 2013. Host preferences of blood-feeding mosquitoes. Annu. Rev. Entomol. 58, 433-453. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153618>
- Talmi-Frank, D., Jaffe, C.L., Nasereddin, A., Warburg, A., King, R., Svobodova, M., Peleg, O., Baneth, G., 2010a. *Leishmania tropica* in rock hyraxes (*Procavia capensis*) in a focus of human cutaneous leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82, 814-818. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0513>
- Talmi-Frank, D., Nasereddin, A., Schnur, L.F., Schönián, G., Töz, S.Ö., Jaffe, C.L., Baneth, G., 2010b. Detection and identification of Old World *Leishmania* by high resolution melt analysis. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, 4-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000581>
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. 10, 512-26.
- Tang, Y., Ward, R.D., 1998. Sugar feeding and fluid destination control in the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Med. Vet. Entomol. 12, 13-19. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00063.x>
- Tarallo, V.D., Dantas-Torres, F., Lia, R.P., Otranto, D., 2010. Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy. Acta Trop. 116, 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.08.013>
- Tello, A., González-Mora, D., Outerelo, R., Iriso, A., Vázquez, M.A., 2015. Los flebotomos del brote

- de leishmaniasis en el suroeste de la Comunidad de Madrid (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol. 109, 57-64.
- Tesh, R.B., Chaniotis, B.N., Aronson, M.D., Johnson, K.M., 1971. Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20, 150-156. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1971.20.150>
- Theodor, O., 1965. On the classification of American phlebotominae. J. Med. Entomol. 2, 171-197. <https://doi.org/10.1007/s11017-014-9301-9>
- Theodor, O., 1948. Classification of the world species of the subfamily Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Bull. Entomol. Res. 39, 85-115.
- Tiwary, P., Kumar, D., Mishra, M., Singh, R.P., Rai, M., Sundar, S., 2013. Seasonal variation in the prevalence of sand flies infected with *Leishmania donovani*. PLoS One 8, 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061370>
- Torina, A., Sole, M., Reale, S., Vitale, F., Caracappa, S., 2008. Use of phlebotomine sand flies as indicator of *Leishmania* prevalence in an endemic area. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1149, 355-357. doi:10.1196/annals.1428.017
- Toz, S.O., Culha, G., Zeyrek, F.Y., Ertabaklar, H., Alkan, M.Z., Vardarli, A.T., Gunduz, C., Özbel, Y., 2013. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002205>
- Trajer, A.J., Bede Fazekas, A., Hufnagel, L., Horvath, L., Bobvos, J., Paldy, A., 2013. The effect of climate change on the potential distribution of the European *Phlebotomus* species. Appl. Ecol. Environ. Res. 11, 189-208.
- Trotz-Williams, L.A., Trees, A.J., 2003. Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. Vet. Rec. 152, 97-105. <https://doi.org/10.1136/vr.152.4.97>
- Trouillet, J., Vattier-Bernard, G., 1979. Cycle annuel de *Sergentomyia bamoni* (Abonnenc, 1958) (Diptera, Psychodidae) en République Populaire du Congo. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 54, 665-672. <https://doi.org/10.1051/parasite/1979546665>
- Tsirigotakis, N., Pavlou, C., Christodoulou, V., Dokianakis, E., Kourouniotis, C., Alten, B., Antoniou, M., 2018. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the Greek Aegean Islands: Ecological approaches. Parasit. Vectors 11, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2680-4>
- Tsokana, C.N., Sokos, C., Giannakopoulos, A., Mamuris, Z., Birtsas, P., Papaspyropoulos, K., Valiakos, G., Spyrou, V., Lefkaditis, M., Chatzopoulos, D.C., Kantere, M., Manolakou, K., Touloudi, A., Burriel, A.R., Ferroglio, E., Hadjichristodoulou, C., Billinis, C., 2016. First evidence of *Leishmania* infection in European brown hare (*Lepus europaeus*) in Greece: GIS analysis and phylogenetic position within the *Leishmania* spp. Parasitol. Res. 115, 313-321. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4749-8>
- Tsukayama, P., Núñez, J.H., De Los Santos, M., Soberón, V., Lucas, C.M., Matlashewski, G., Llanos-Cuentas, A., Ore, M., Baldeviano, G.C., Edgel, K.A., Lescano, A.G., Graf, P.C.F., Bacon, D.J., 2013. A FRET-based real-time PCR assay to identify the main causal agents of New World tegumentary leishmaniasis. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, e1956. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001956>
- Úbeda-Ontiveros, J., Morillas-Márquez, F., Guevara-Benítez, D., López-Román, R., Cutillas-

Bibliografía

- Barrios, C., 1982. Flebotomos de las Islas Canarias (España). Rev. Ibérica Parasitol. 197-206.
- Universidad de Liverpool, 2018. http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle__habitats.htm
- Valinsky, L., Ettinger, G., Bar Gal, G.K., Orshan, L., 2014. Molecular identification of bloodmeals from sand flies and mosquitoes collected in Israel. J. Med. Entomol. 51, 678-685. <https://doi.org/10.1603/ME13125>
- Van der Auwera, G., Dujardin, J.C., 2015. Species typing in dermal leishmaniasis. Clin. Microbiol. Rev. 28, 265-294. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-14>
- Van Griensven, J., Carrillo, E., López-Vélez, R., Lynen, L., Moreno, J., 2014. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. Clin. Microbiol. Infect. 20, 286-299. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12556>
- Vanhollebeke, B., Truc, P., Poelvoorde, P., Pays, A., Joshi, P.P., Katti, R., Jannin, J.G., Pays, E., 2006. Human *Trypanosoma evansi* infection linked to a lack of apolipoprotein L-I. N. Engl. J. Med. 355, 2752-2756. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa063265>
- Velo, E., Bongiorno, G., Kadriaj, P., Myrseli, T., Crilly, J., Lika, A., Mersini, K., Di Muccio, T., Bino, S., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 2017. The current status of phlebotomine sand flies in Albania and incrimination of *Phlebotomus neglectus* (Diptera, Psychodidae) as the main vector of *Leishmania infantum*. PLoS One 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179118>
- Velo, E., Paparisto, A., Bongiorno, G., Di Muccio, T., Khoury, C., Bino, S., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 2005. Entomological and parasitological study on phlebotomine sandflies in central and northern Albania. Parasite 12, 45-49. <https://doi.org/10.1051/parasite/2005121045>
- Verma, A., Manchanda, S., Kumar, N., Sharma, A., Goel, M., Banerjee, P.S., Garg, R., Singh, B.P., Balharbi, F., Lejon, V., Deborggraeve, S., Rana, U.V.S., Puliyl, J., 2011. Case report: *Trypanosoma lewisi* or *T. lewisi*-like infection in a 37-day-old Indian infant. Am. J. Trop. Med. Hyg. 85, 221-224. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0002>
- Vilas, F., Carpintero, J., Sevilla, S., Martínez, A., Ordobás, M., Bernal, J., Díaz, R., Iriso, A., Sevillano, O., Escacena, C., De La Fuente, S., Arce, A., Estirado, A., Frutos, J., Fúster, F., 2012. Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. Medidas de investigación y control medioambiental. Profesión Veterinaria 17, 6-15.
- Viola, L.B., Campaner, M., Takata, C.A., Ferreira, R.C., Rodrigues, A.C., Freitas, R.A., Duarte, M.R., Grego, K.F., Barrett, T. V., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., 2008. Phylogeny of snake trypanosomes inferred by SSU rDNA sequences, their possible transmission by phlebotomines, and taxonomic appraisal by molecular, cross-infection and morphological analysis. Parasitology 135, 595-605. <https://doi.org/10.1017/S0031182008004253>
- Volf, P., Myskova, J., 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. Trends Parasitol. 23, 91-92. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.12.010>
- Volf, P., Volfova, V., 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. J. Vector Ecol. 36, S1-S9. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x>
- Volpini, Â.C., Passos, V.M.A., Oliveira, G.C., Romanha, A.J., 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. Acta Trop. 90, 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.10.008>
- Vrhovec, M.G., Pantchev, N., Failing, K., Bauer, C., Travers-Martin, N., Zahner, H., 2017.

- Retrospective analysis of canine vector-borne diseases (CVBD) in Germany with emphasis on the endemicity and risk factors of leishmaniosis. *Parasitol. Res.* 116, 131-144. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5499-6>
- Walters, L.L., 1993. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sandfly hosts. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40, 196-206. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04903.x>
- Walters, L.L., Irons, K.P., Chaplin, G., Tesh, R.B., 1993. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 30, 699-718. <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.4.699>
- Warburg, A., 2008. The structure of the female sand fly (*Phlebotomus papatasi*) alimentary canal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 161-166. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.10.004>
- Warburg, A., Faiman, R., 2011. Research priorities for the control of phlebotomine sand flies. *J. Vector Ecol.* 36, S10-16.
- Weirather, J.L., Jeronimo, S.M.B., Gautam, S., Sundar, S., Kang, M., Kurtz, M.A., Haque, R., Schriefer, A., Talhari, S., Carvalho, E.M., Donelson, J.E., Wilson, M.E., 2011. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3892-3904. <https://doi.org/10.1128/JCM.r00764-11>
- Wermelinger, E.D., Zanuncio, J.C., Rangel, E.F., Cecon, P.R., Rabinovitch, L., 2000. Toxicity of *Bacillus* species to larvae of *Lutzomyia longipalpis* (L. & N.) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *An. da Soc. Entomológica do Bras.* 29, 609-614. <https://doi.org/10.1590/S0301-80592000000300025>
- Wilson, R., Bates, M.D., Dostalova, A., Jecna, L., Dillon, R.J., Volf, P., Bates, P.A., 2010. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000816>
- Wirth, D.F., Pratt, D.M., 1982. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 6999-7003. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.22.6999>
- Yaghoobi-Ershadi, M.R., 2016. Control of phlebotomine sand flies in Iran: A review article. *J. Arthropod. Borne. Dis.* 10, 429-444.
- Yan, S., Lodes, M.J., Fox, M., Myler, P.J., Stuart, K., 1999. Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter. *Mol. Biochem. Parasitol.* 103, 197-210. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00126-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00126-7)
- Young, D.G., Duncan, M.A., 1994. Guide of the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 54, 1-881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Yssouf, A., Almeras, L., Raoult, D., Parola, P., 2016. Emerging tools for identification of arthropod vectors. *Future Microbiol.* 11, 549-566. <https://doi.org/10.2217/fmb.16.5>
- Zampieri, R.A., Laranjeira Silva, M.F., Muxel, S.M., Stocco de Lima, A.C., Shaw, J.J., Floeter Winter, L.M., 2016. High resolution melting analysis targeting hsp70 as a fast and efficient method for the discrimination of *Leishmania* species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004485>

Bibliografía

- Zanet, S., Chiari, E., Battisti, E., Tizzani, P., Trisciuglio, A., Carnaroglio, L.T., Lavazza, A., Ferroglio, E., 2017. Epidemiology of *Leishmania infantum* infection in wild lagomorphs in Italy. En: World Congress on Leishmaniasis 6, 16-20 mayo, Toledo, España.
- Zanette, M.F., de Lima, V.M.F., Laurenti, M.D., Rossi, C.N., Vides, J.P., Vieira, R.F. da C., Biondo, A.W., Marcondes, M., 2014. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* chagasi tests in dogs. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 47, 105-107. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-1723-2013>
- Zeledón, R., Rosabal, R., 1969. *Trypanosoma leonidasdeanei* sp. nov. in insectivorous bats of Costa Rica. Ann. Trop. Med. Parasitol. 63, 221-228. <https://doi.org/10.1080/00034983.1969.11686623>
- Zemanová, E., Jirků, M., Mauricio, I.L., Horák, A., Miles, M.A., Lukeš, J., 2007. The *Leishmania donovani* complex: Genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. Int. J. Parasitol. 37, 149-160. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.08.008>
- Zivković, V., Miscevic, Z., Movsesijan, M., 1973. Identification of blood meals of sandflies (Diptera: Psychodidae). J. Parasitol. 59, 1150. <https://doi.org/10.2307/3278666>

ANEXOS

8. ANEXO 1

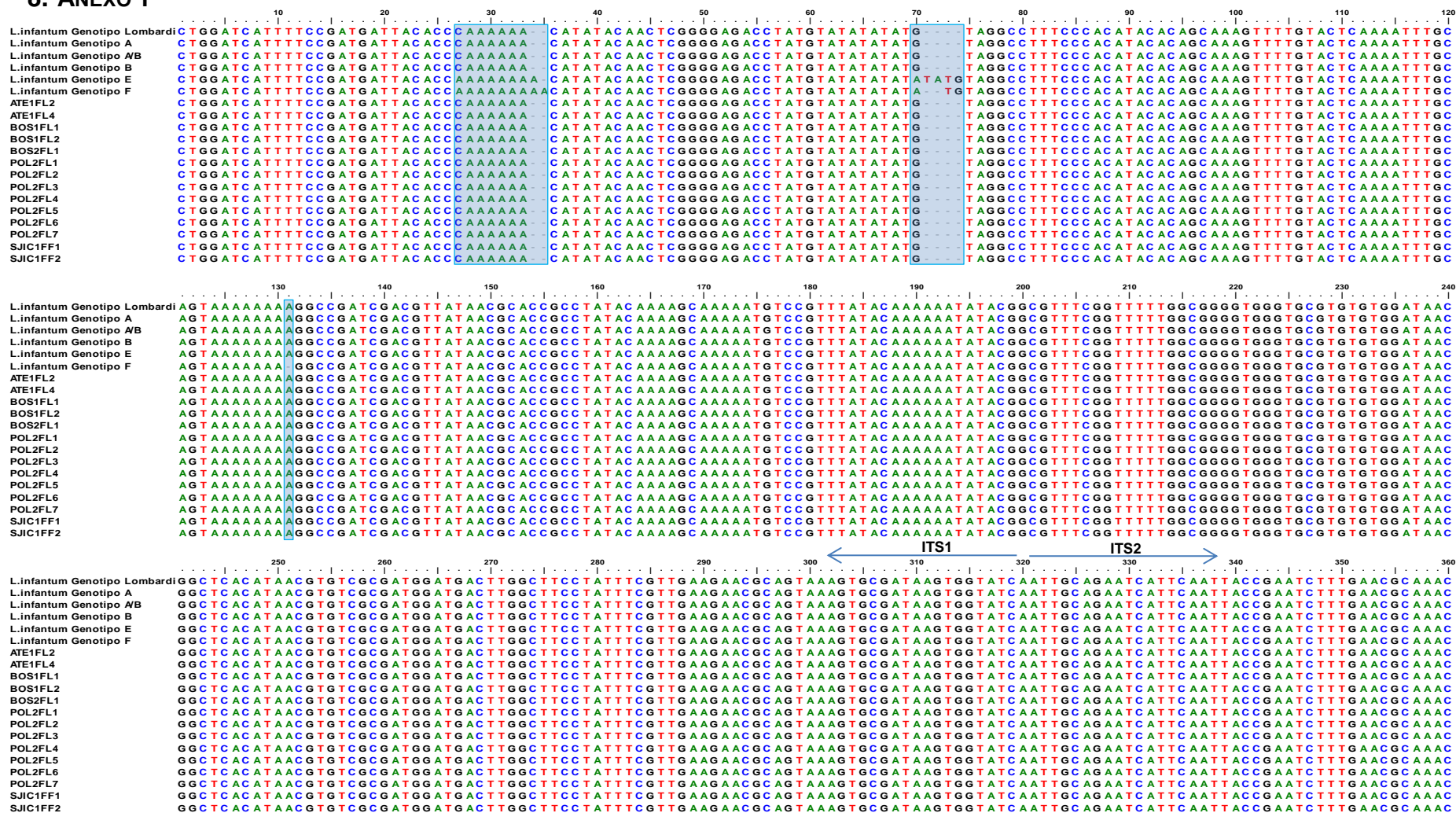
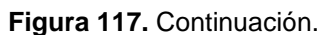


Figura 117. Alineamiento de las secuencias ITS de los aislados a partir de flebotomos capturados en el periodo de muestreo 2012. Genotipo Lombardi (AJ000295); genotipo A (AJ634341); genotipo A/B (AJ634355); genotipo B (AJ000288); genotipo E (AJ634361); genotipo F (AJ634370).



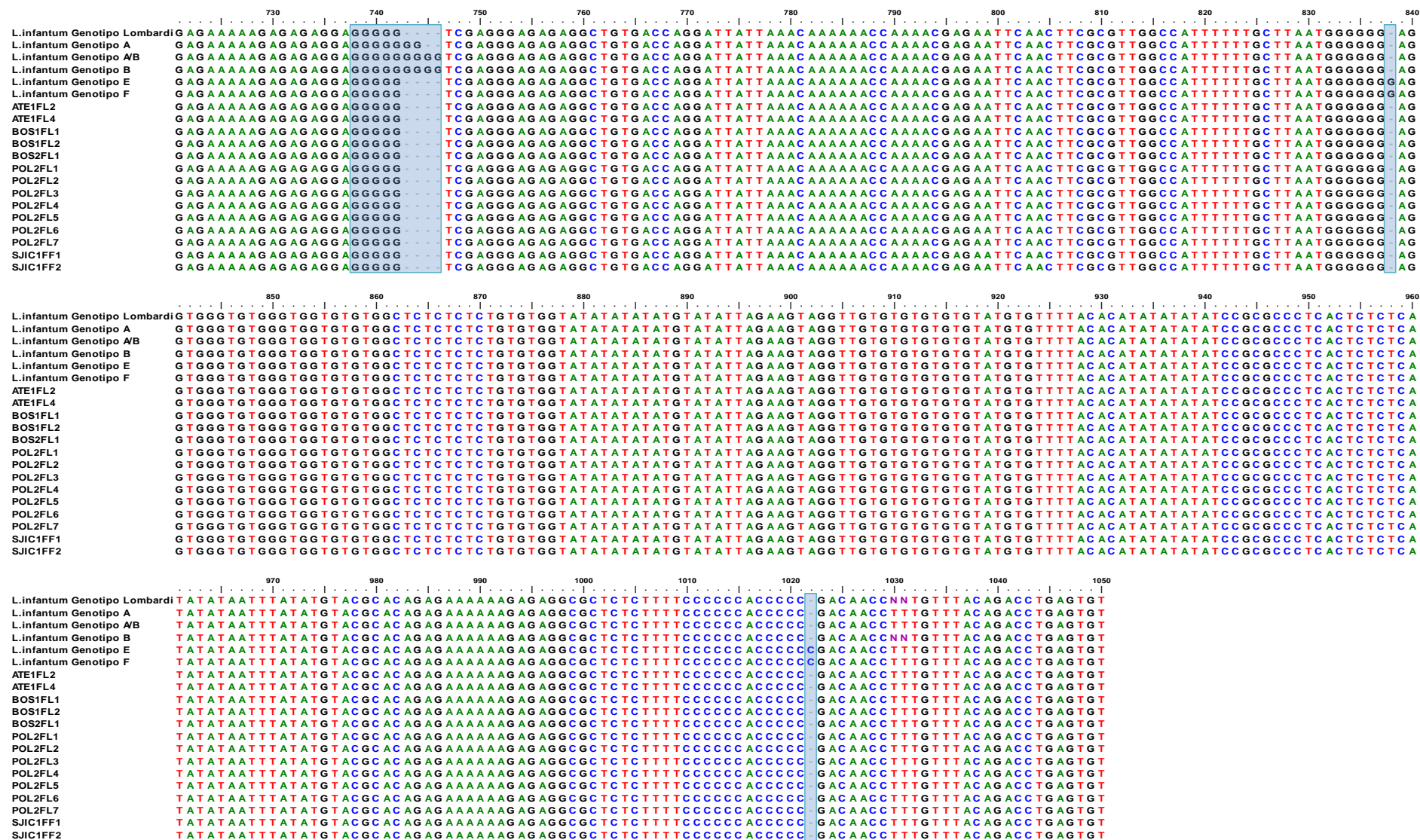


Figura 117. Continuación.

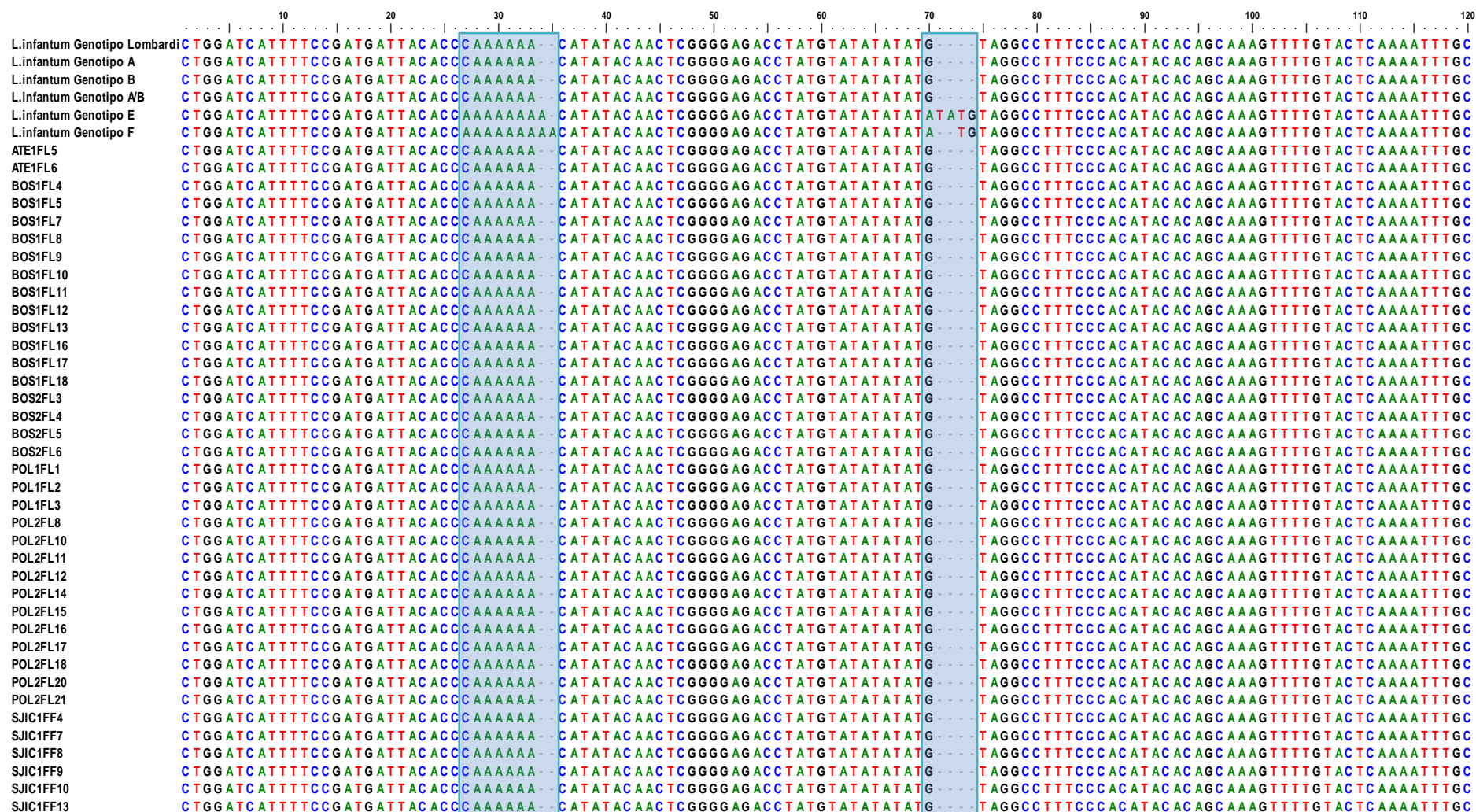


Figura 118. Alineamiento de las secuencias ITS de los aislados a partir de flebotomos capturados en el periodo de muestreo 2013. Genotipo Lombardi (AJ000295); genotipo A (AJ634341); genotipo A/B (AJ634355); genotipo B (AJ000288); genotipo E (AJ634361); genotipo F (AJ634370).

Anexo

	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
							ITS1		ITS2			
L.infantum Genotipo Lombardi	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
L.infantum Genotipo A	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
L.infantum Genotipo B	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
L.infantum Genotipo A/B	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
L.infantum Genotipo E	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
L.infantum Genotipo F	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
ATE1FL5	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
ATE1FL6	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS1FL4	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS1FL5	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS1FL7	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS1FL8	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS1FL9	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS1FL10	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS1FL11	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS1FL12	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS1FL13	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS1FL16	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS1FL17	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS1FL18	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS2FL3	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS2FL4	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS2FL5	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
BOS2FL6	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL1FL1	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL1FL2	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL1FL3	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL2FL8	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL2FL10	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL2FL11	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL2FL12	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL2FL14	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL2FL15	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL2FL16	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL2FL17	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL2FL18	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL2FL20	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
POL2FL21	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
SJIC1FF4	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
SJIC1FF7	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
SJIC1FF8	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
SJIC1FF9	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
SJIC1FF10	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C
SJIC1FF13	G	G	C	T	C	A	C	A	T	A	A	C

Figura 118. Continuación.

Anexo

		490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
L.infantum Genotipo Lombardi	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
L.infantum Genotipo A	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
L.infantum Genotipo B	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
L.infantum Genotipo A/B	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
L.infantum Genotipo E	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
L.infantum Genotipo F	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
ATE1FL5	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
ATE1FL6	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS1FL4	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS1FL5	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS1FL7	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS1FL8	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS1FL9	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS1FL10	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS1FL11	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS1FL12	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS1FL13	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS1FL16	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS1FL17	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS1FL18	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS2FL3	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS2FL4	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS2FL5	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
BOS2FL6	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL1FL1	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL1FL2	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL1FL3	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL2FL8	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL2FL10	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL2FL11	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL2FL12	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL2FL14	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL2FL15	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL2FL16	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL2FL17	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL2FL18	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL2FL20	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
POL2FL21	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
SJIC1FF4	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
SJIC1FF7	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
SJIC1FF8	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
SJIC1FF9	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
SJIC1FF10	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A
SJIC1FF13	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A

Figura 118. Continuación.

Figura 118. Continuación.

[illegible]

Figura 118. Continuación.

	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960
L.infantum Genotipo Lombardi	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
L.infantum Genotipo A	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
L.infantum Genotipo B	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
L.infantum Genotipo A/B	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
L.infantum Genotipo E	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
L.infantum Genotipo F	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
ATE1FL5	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
ATE1FL6	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS1FL4	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS1FL5	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS1FL7	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS1FL8	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS1FL9	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS1FL10	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS1FL11	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS1FL12	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS1FL13	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS1FL16	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS1FL17	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS1FL18	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS2FL3	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS2FL4	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS2FL5	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
BOS2FL6	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL1FL1	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL1FL2	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL1FL3	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL2FL8	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL2FL10	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL2FL11	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL2FL12	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL2FL14	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL2FL15	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL2FL16	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL2FL17	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL2FL18	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL2FL20	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
POL2FL21	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
SJIC1FF4	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
SJIC1FF7	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
SJIC1FF8	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
SJIC1FF9	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
SJIC1FF10	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG
SJIC1FF13	G	TGGG	TG	TGGG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG	TG

Figura 118. Continuación.

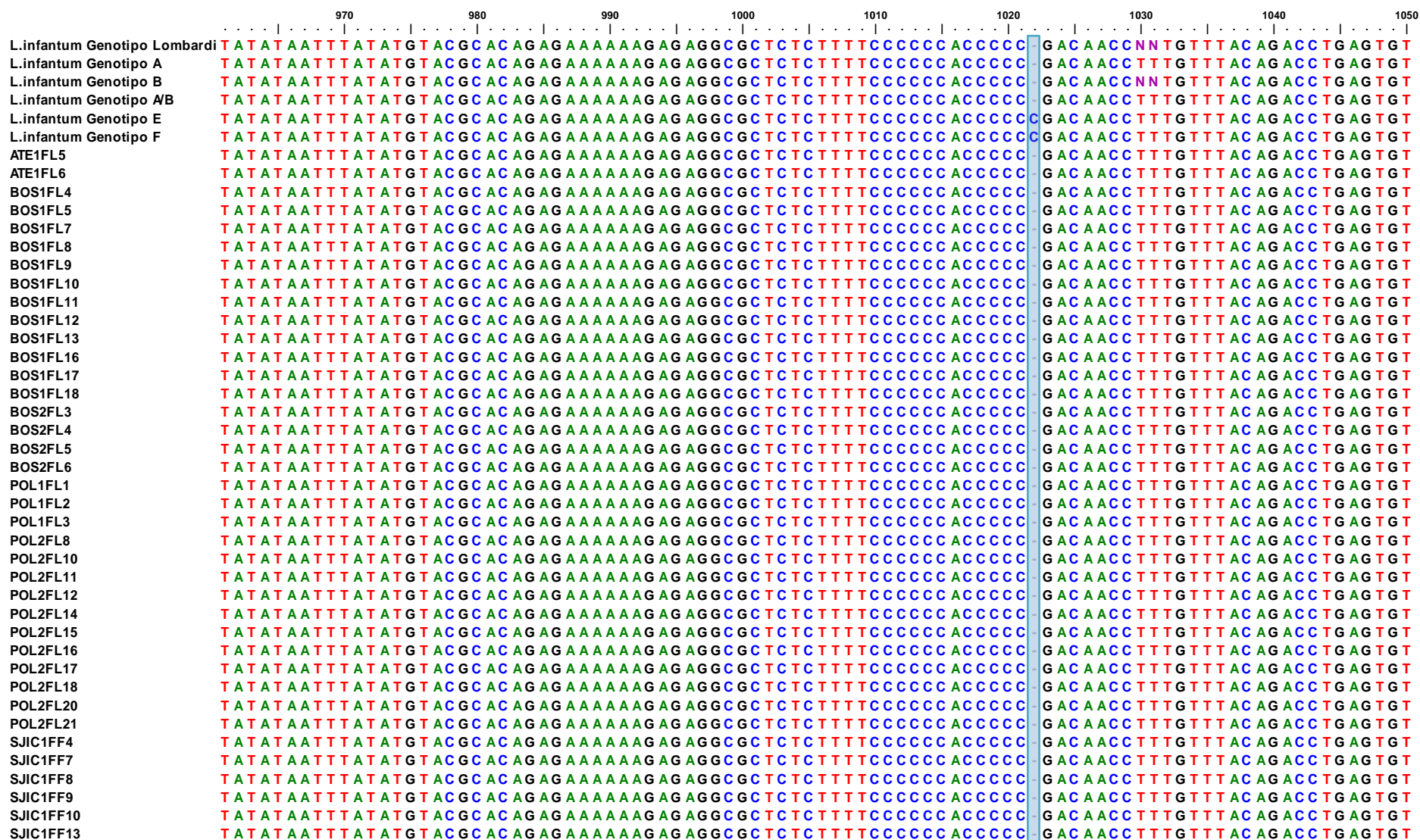


Figura 118. Continuación.

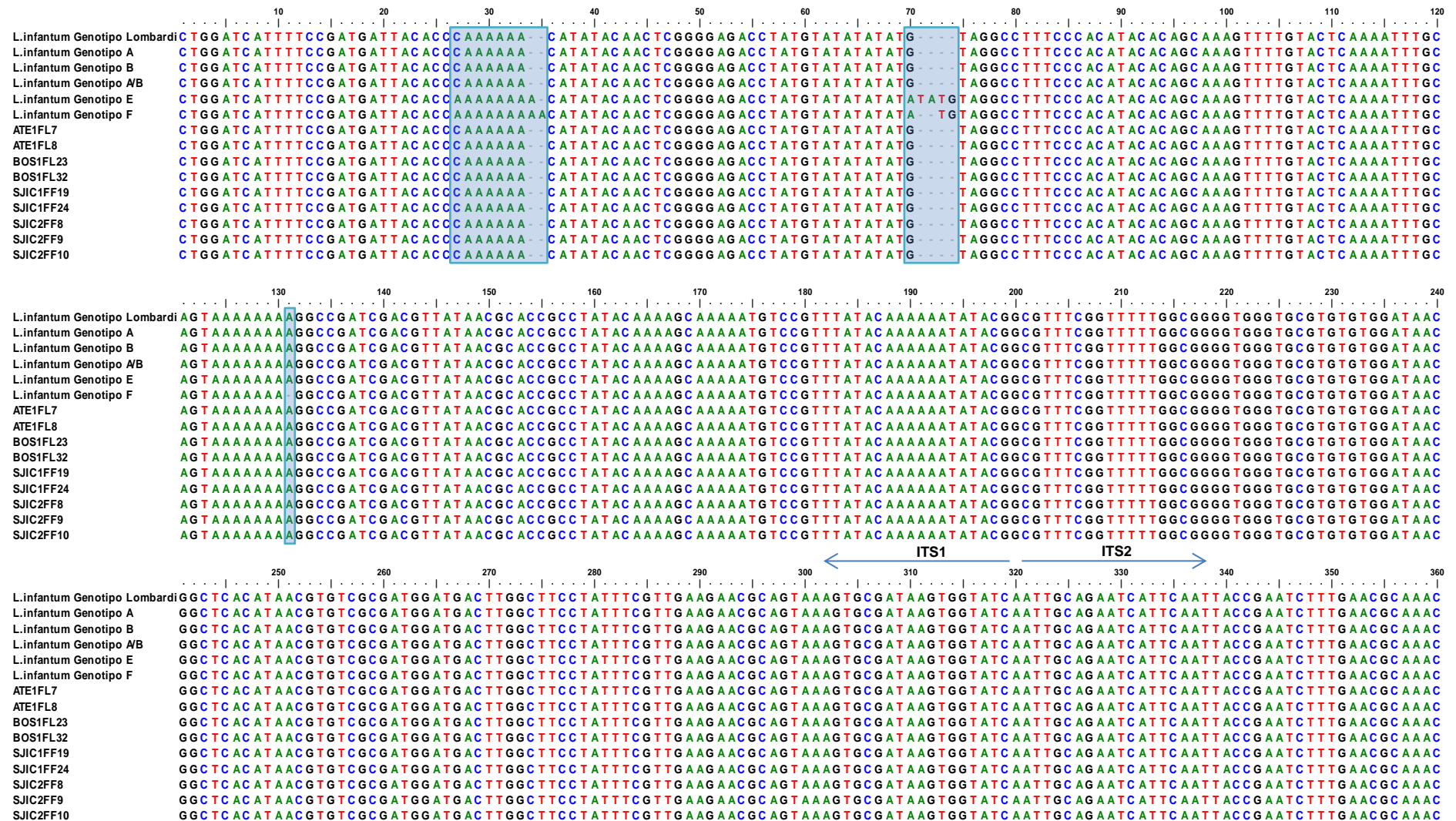


Figura 119. Alineamiento de las secuencias ITS de los aislados a partir de flebotomos capturados en el periodo de muestreo 2014. Genotipo Lombardi (AJ000295); genotipo A (AJ634341); genotipo A/B (AJ634355); genotipo B (AJ000288); genotipo E (AJ634361); genotipo F (AJ634370).



9. Anexo 2

9.1. Secuencias ITS1 de *T. nabiasi*

>LC339503. *Trypanosoma nabiasi* F44 gene for ITS1, partial sequence.

```

1 ctggatcatt ttccgatgat tttatattat acatacaacc gcgagaagag aggaggaggg
61 tatatctctc tctgtgtgtg tgtgtgtgtg caagaggggg aaaagggtatg gtgtattttt
121 gtatataactt gcctgtgtgt accccttgtg tattgtgagc accacacact ctcttcttcg
181 cactacacat atatctcctc gacacattgt gcgcatatat atatatatat atatagtgtg
241 tgctctaagt gttgtggaaa aagtaacttg ccgcttgacc tcgtgtgtgg atatggtgtg
301 tagtgtctgt gtggtgtttg tttatatata tatatatata tataaacagg tgcgcacata
361 cacacaccca gaaaagaaca cgtcgtgaag cacggcccca acaacgtgtc gcgatggatg
421 acttggcttc ctatttcgta gaagaacgca gcaaagtgcg ataagtggta tc

```

>LC339504. *Trypanosoma nabiasi* F47 gene for ITS1, partial sequence.

```

1 ctggatcatt ttccgatgat tttatattat acatacaacc gcgagaagag aggaggaggg
61 tatatctctc tctgtgtgtg tgtgtgtgtg caagaggggg aaaagggtatg gtgtattttt
121 gtatataactt gcctgtgtgt accccttgtg tattgtgagc accacacact ctcttcttcg
181 cactacacat atatctcctc gacacattgt gcgcatatat atatatatat atatatatat
241 aatgtgtgtg ctctaagtgt tgtggaaaaa gtaacttgcc gcttgacctc gtgtgtggat
301 atggtgtgta gtgtctgtgt ggtgtttgtt tatatatata tatatacata taaacagggt
361 cgcacataca cacaccacaga aaagaacacg tcgtgaagca cggccccaac aacgtgtcgc
421 gatggatgac ttggcttcct atttcgtaga agaacgcagc aaagtgcgat aagtggatat
481 a

```

>LC339505. *Trypanosoma nabiasi* F24 gene for ITS1, partial sequence.

```

1 ctggatcatt ttccgatgat tttatattat acatacacac ccccgagaag agaggaggag
61 ggtatatctc tctctgtgtg tgtgtgtgtg tgcaagaggg ggaaaagata tgggtgtattt
121 ttgtatatac ttgcctgtgt gtacccttgg tgtattgtga gcaccacaca ctctcttctt
181 cgcactacac atatatctcc tcgacacatt gtgcgcatat atatatatat atatatatata
241 tgtgtgtgct ctaagtgttg tggaaaaagt aacttgccgc ttgacctcgt gtgtggatat
301 ggtgtgtagt gtctgtgtgg tgtttgttta tatatatata tatacatata aacagggtgcg
361 cacatacaca caccagaaa agaacacgtc gtgaagcacg gcccacaaca cgtgtcgcga
421 tggatgactt ggcttcctat ttcgtagaag aacgcagcaa agtgcgataa gtgggtatca

```

>LC339506. *Trypanosoma nabiasi* F25 gene for ITS1, partial sequence.

```

1 ctggatcatt ttccgatgat tttatattat acatacaacc gcgagaagag aggaggaggg
61 tatatctctc tctgtgtgtg tgtgtgtgtg caagaggggg aaaagggtatg gtgtattttt
121 gtatataactt gcctgtgtgt accccttgtg tattgtgagc accacacact ctcttcttcg

```

181 cactacacat atatctcctc gacacattgt gcgcatatat atatatatat atatatatat
 241 aatgtgtgtg ctctaagtgt tgtggaaaaa gtaacttgcc gcttgacctc gtgtgtggat
 301 atggtgtgta gtgtctgtgt ggtgtttgtt tatatatata tatatacata taaacaggtg
 361 cgcacataca cacaccaga aaagaacacg tcgtgaagca cggccccaac aacgtgtcgc
 421 gatggatgac ttggcttcct atttcgtaga agaacgcagc aaagtgcgat aagtggatc
 481 a

>LC339507. *Trypanosoma nabiasi* F27 gene for ITS1, partial sequence.

1 gcgagaagag aggaggaggg tatatctctc tctgtgtgtg tgtgtgtgtg caagaggggg
 61 aaaaggtatg gtgtatTTTT gtatatactt gcctgtgtgt accccttgtg tattgtgagc
 121 accacacact ctcttcttcg cactacacat atatctcctc gacacattgt gcgcatatat
 181 atatatatat atatataatg tgtgtgctat aagtgttgtg gaaaaagtaa cttgccgctt
 241 gacctcgtgt gtggatatgg tgtgtagtgt ctgtgtggtg tttgtttata tatatatata
 301 tacatataaaa caggtgcgca catacacaca ccagaaaaag aacacgtcgt gaagcacggc
 361 cccaacaacg tgtcgcgatg gatgactt

>LC339508. *Trypanosoma nabiasi* F114 gene for ITS1, partial sequence.

1 ctggatcatt ttccgatgat tttatattat acatacaacc gcgagaagag aggaggaggg
 61 tatatctctc tctgtgtgtg tgtgtgtgtg caagaggggg aaaaggtatg gtgtatTTTT
 121 gtatatactt gcctgtgtgt accccttgtg tattgtgagc accacacact ctcttcttcg
 181 cactacacat atatctcctc gacacattgt gcgcatatat atatatatat atatatatat
 241 aatgtgtgtg ctctaagtgt tgtggaaaaa gtaacttgcc gcttgacctc gtgtgtggat
 301 atggtgtgta gtgtctgtgt ggtgtttgtt tatatatata tatatacata taaacaggtg
 361 cgcacataca cacaccaga aaagaacacg tcgtgaagca cggccccaac aacgtgtcgc
 421 gatggatgac ttggcttcct atttcgtaga agaacgcagc aaagtgcgat aagtggatc
 481 a

9.2. Secuencias ARNr SSU de *T. nabiasi*

>LC341261. *Trypanosoma nabiasi* F47 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence.

1 gaaacaagaa acacgggagt ggttcctttc ctgattttcg catgtcatgc atgccagggg
 61 gcgcccgtga ttttttactg tgactaaaaa agtgtgacca aagcagtcac ttcgacttga
 121 attagaaaagc atgggataac aaaggagcag cctataggcc accgtttcgg cttttgttgg
 181 ttttaacagt ctattggaga ttatggggct gtgcgacaag cgctcgagtg ctctcctttt
 241 cggtgacgct cggcgccttt gtgggaaatc cacggttgcc tcggcaggct tcggcctcgc
 301 ggagagcatt tccgtcttcc ctcaactcgc ggcatccagg aatgaaggag ggtagtccgg
 361 gggggaacgt actggtgcgt cagaggtgaa attcttagac cgcaccaaga cgaactacag
 421 cgaaggcatt cttcaaggat accttcctca atcaagaacc aaagtgtggg gatcgaagat
 481 gattagagac cattgtagtc cacactgcaa acgatgacac ccatgaattg gggagttttt

Anexo

541 ggtcgtaggc ggggtcgggt tcatctcgct cctcgtctcg ccaatgtgta tcaatttacg
601 tgcataattct ttttgggccc cgcgaggggt ccgtttacgg gaatatacctc agcacgttat
661 ctgacttctt cacgcgaaaag ctttgagggt acagtctcag gggggagtac gttcgcaaga
721 gtgaaactta aagaaattga cggaatggca ccacaagacg tggagcgtgc ggtttaattt
781 gactcaacac ggggaacttt accagatccg gacaggggtga ggattgacag attgagtgtt
841 ctttctcgat ccctgaatg gtggtgcatg gccgcttttg gtcggtggag tg

>LC341262. *Trypanosoma nabiasi* F47 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence.

1 gaaacaagaa acacgggagt ggttcctttc ctgattttcg catgtcatgc atgccagggg
61 gcgcccgtga ttttttactg tgactaaaaa agtgtgacca aagcagtcac ttcgacttga
121 attagaaagc atgggataac aaaggagcag cctataggcc accgtttcgg cttttgttgg
181 ttttaacagt ctattggaga ttatggggct gtgcgacaag cgctcgagtgc ctctcctttt
241 cgggtgacgct cggcgccttt gtgggaaatc cacggttgcc tcggcaggct tcggcctcgc
301 ggagagcatt tccgtcttcc ctcaactcgc ggcatccagg aatgaaggag ggtagttcgg
361 gggggaacgt actggtgctg cagaggtgaa attcttagac cgcaccaaga cgaactacag
421 cgaaggcatt cttcaaggat accttcctca atcaagaacc aaagtgtggg gatcgaagat
481 gattagagac cattgtagtc cacactgcaa acgatgacac ccatgaattg gggagttttt
541 ggtcgtaggc ggggtcgggt tcatctcgct cctcgtctcg ccaatgtgta tcaatttacg
601 tgcataattct ttttgggccc cgcgaggggt ccgtttacgg gaatatacctc agcacgttat
661 ctgacttctt cacgcgaaaag ctttgagggt acagtctcag gggggagtac gttcgcaaga
721 gtgaaactta aagaaattga cggaatggca ccacaagacg tggagcgtgc ggtttaattt
781 gactcaacac ggggaacttt accagatccg gacaggggtga ggattgacag attgagtgtt
841 ctttctcgat ccctgaatg gtggtgcatg gccgcttttg gtcggtggag tgatttggtt
901 ggtagattcc gtcaacggac gagatc

>LC341263. *Trypanosoma nabiasi* F51 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence.

1 gaaacaagaa acacgggagt ggttcctttc ctgattttcg catgtcatgc atgccagggg
61 gcgcccgtga ttttttactg tgactaaaaa agtgtgacca aagcagtcac ttcgacttga
121 attagaaagc atgggataac aaaggagcag cctataggcc accgtttcgg cttttgttgg
181 ttttaacagt ctattggaga ttatggggct gtgcgacaag cgctcgagtgc ctctcctttt
241 cgggtgacgct cggcgccttt gtgggaaatc cacggttgcc tcggcaggct tcggcctcgc
301 ggagagcatt tccgtcttcc ctcaactcgc ggcatccagg aatgaaggag ggtagttcgg
361 gggggaacgt actggtgctg cagaggtgaa attcttagac cgcaccaaga cgaactacag
421 cgaaggcatt cttcaaggat accttcctca atcaagaacc aaagtgtggg gatcgaagat
481 gattagagac cattgtagtc cacactgcaa acgatgacac ccatgaattg gggagttttt
541 ggtcgtaggc ggggtcgggt tcatctcgct cctcgtctcg ccaatgtgta tcaatttacg
601 tgcataattct ttttgggccc cgcgaggggt ccgtttacgg gaatatacctc agcacgttat
661 ctgacttctt cacgcgaaaag ctttgagggt acagtctcag gggggagtac gttcgcaaga
721 gtgaaactta aagaaattga cggaatggca ccacaagacg tggagcgtgc ggtttaattt

781 gactcaacac ggggaacttt accagatccg gacaggggtga ggattgacag attgagtgtt
 841 ctttctcgat cccctgaatg gtgggtgcatg gccgcttttg gtcggtggag tgatttgttt
 901 ggttgattcc gtcaacggac g

>LC341264. *Trypanosoma nabiasi* F114 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence.

1 gatttttcgca tgtcatgcat gccagggggc gcccgatgatt ttttactgtg actaaaaaag
 61 tgtgaccaaa gcagtcattt cgacttgaat tagaaagcat gggataacaa aggagcagcc
 121 tataggccac cgtttcggct tttgttggtt ttaacagtct attggagatt atggggctgt
 181 gcgacaagcg ctcgagtgtc ctcccttttcg gtgacgctcg gcgcctttgt gggaaatcca
 241 cggttgcctc ggcaggcttc ggcctcgcgg agagcatttc cgtcttccct caactcgcg
 301 catccaggaa tgaaggaggg tagttcgggg gggaacgtac tgggtgcgtca gaggtgaaat
 361 tcttagaccg caccaagacg aactacagcg aaggcattct tcaaggatac cttcctcaat
 421 caagaaccaa agtgtgggga tcgaagatga ttagagacca ttgtagtcca cactgcaaac
 481 gatgacaccc atgaattggg gagtttttgg tcgtaggcgg ggtcgggttc atctcgctcc
 541 tcgtctcgcc aatgtgtatc aatttacgtg catattcttt ttgggccccg cgaggggtcc
 601 gtttacggga atatcctcag cacgttatct gacttcttca cgcgaaagct ttgaggttac
 661 agtctcaggg gggagtacgt tcgcaagagt gaaacttaaa gaaattgacg gaatggcacc
 721 acaagacgtg gagcgtgcgg tttaatttga ctcaacacgg ggaactttac cagatccgga
 781 cagggtgagg attgacagat tgagtgttct ttctcgatcc cctgaatggg ggtgcatggc
 841 cgcttttggg cggtggagtg atttgttttg ttgattccgt caacggacga gatccaagct
 901 gcccagtag

APÉNDICE

10. APÉNDICE

10.1. Abreviaturas

A

A_{260}	Absorbancia a 260 nanómetros
A_{280}	Absorbancia a 280 nanómetros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNk	Ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto
ADNr	ADN ribosomal
AEMET	Agencia Estatal de Meteorología
Ago	Agosto
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
Atm	Atmósfera
ATSB	Cebo de azúcar tóxico (<i>Attractive toxic sugar bate</i>)

B

BECM	Boletín Epidemiológico de la Comunidad de Madrid
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)

C

CDC	Centro para Control y Prevención de Enfermedades (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CEA	Centro de Educación Ambiental
CEE	Colegio de Educación Especial
CM	Comunidad de Madrid
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro cuadrado
CMBD	Conjunto Mínimo Básico de Datos
CNM	Centro Nacional de Microbiología
CO ₂	Dióxido de carbono
CO	Citocromo <i>c</i> oxidasa
COLVEMA	Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid
<i>cpb</i>	Cisteína proteinasa <i>b</i>
c.s.p.	Cantidad suficiente para
Ct	Ciclo umbral (<i>Threshold point</i>)
<i>cytb</i>	Citocromo <i>b</i> (<i>Cytochrome b</i>)

D

DDBJ	<i>DNA Databank of Japan</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato

E

EDO	Enfermedad de declaración obligatoria
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)

Apéndice

EMBL	European Molecular Biology Laboratory
F	
fg	Femtogramo
fPPG	Fosfoproteoglicano filamentoso (<i>Filamentous proteophosphoglycan</i>)
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>)
G	
g	Gramo
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
H	
h	Hora
ha	Hectárea
Ha	Haptomona
HR	Humedad relativa
HRM	Análisis de alta resolución de fusión (<i>High resolution melting</i>)
HSP	Proteína de choque térmico (<i>Heat shock protein</i>)
I	
IFAT	Detección de anticuerpos mediante inmunofluorescencia (<i>Immunofluorescence antibody test</i>)
IES	Instituto de Educación Secundaria
INE	Instituto Nacional de Estadística
ITNs	<i>Insecticide-treated nets</i>
ISCI	Instituto de Salud Carlos III
ITS	Espaciador transcrito interno (<i>Internal transcribed spacer</i>)
J	
Jul	Julio
Jun	Junio
K	
kb	Kilobase
Kg	Kilogramo
km	Kilómetro
L	
l	Litro
LC	Leishmaniosis cutánea
LC-MS/MS	Espectrometría de masas en tándem ligada a cromatografía líquida (<i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>)
Le	Leptomona
LED	Diodos emisores de luz (<i>Light-emitting diode</i>)
LEM	Laboratorio de Entomología Médica
LLINs	<i>Long-lasting insecticidal nets</i>
LPG	Lipofosfoglicano
LSU	Subunidad grande (<i>Large subunit</i>)
LV	Leishmaniosis visceral

M

m	Metro
m ²	Metro cuadrado
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz- tiempo de vuelo (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight</i>)
Me	Metacíclico
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro
MLEE	Electroforesis de enzimas multilocus (<i>Multilocus enzyme electrophoresis</i>)
MLMT	Genotipado de multilocus microsatélite (<i>Multilocus microsatellite typing</i>)
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MP	Membrana peritrófica
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass spectrometry</i>)

N

N1	Primera noche
N2	Segunda noche
NaCl	Cloruro sódico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Ne	Nectomona
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
NNN	Novy-McNeal-Nicolle
NTD	Enfermedad tropical olvidada (<i>Neglected tropical disease</i>)

O

Oct	Octubre
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud

P

Pa	Pascales
pb	Par de bases
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pg	Picogramo
PKDL	Leishmaniosis cutánea poskala-azar (<i>Post-kala-azar dermal leishmaniasis</i>)
pmol	Picomol
PNOC	Gen nuclear de la prepronociceptina
Pp	Promastigote procíclico

Apéndice

PSG	Gel secretado por promastigotes (<i>Promastigote secretory gel</i>)
Q	
qPCR	PCR cuantitativa (<i>quantitative PCR</i>)
R	
r	Coeficiente de correlación
R ²	Coeficiente de determinación
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (<i>Random amplified polymorphic DNA</i>)
RD	Real Decreto
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)
RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
RLB	Alineación reversa <i>line-blot</i> (<i>Reverse line blot</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
S	
s	Segundo
S	Svedberg
SBF	Suero Bovino Fetal
Sep	Septiembre
SI	Sistema Internacional de Unidades
SIDA	Síndrome inmunodeficiencia adquirida
spp.	Especies
SSU	Subunidad pequeña (<i>Small subunit</i>)
T	
T ^a	Temperatura
TAE	Tampón Tris Acetato EDTA
TARGA	Terapia antirretroviral de gran actividad
U	
U	Unidad de actividad enzimática
UDVP	Usuario de drogas por vía parenteral
UV	Ultravioleta
V	
V	Voltio
VBD	Enfermedad transmitida por vector (<i>Vector-borne disease</i>)
VE	Válcula estomodeal
VIH	Virus inmunodeficiencia humana
VISAVET	Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria
VNTR	Repetición en tándem de número variable (<i>Variable number tandem repetition</i>)
6PGDH	6-fosfogluconato deshidrogenasa
°C	Grados Celsius
μl	Microlitro

NOTA:

En la redacción de esta Tesis Doctoral se han utilizado ciertas unidades de medida fuera del Sistema Internacional de Unidades (SI). En la siguiente tabla, se muestran las correspondencias de las unidades utilizadas con las admitidas en el SI:

atm	101.325 Pa
cm ²	10 ⁻⁴ m ²
h	3.600 s
ha	10.000 m ²
mg	10 ⁻³ kg
min	60 s
ml	10 ⁻³ l
nm	10 ⁻⁹ m
S	10 ⁻¹³ s
μl	10 ⁻⁶ l

10.2. Índice de figuras

Introducción

Figura 1. Ciclo de <i>Leishmania</i> en el flebotomo y en el hospedador vertebrado. Fuente: modificado de Esch y Petersen, 2013.	8
Figura 2. Manifestaciones clínicas de la leishmaniosis. A) Lesión cutánea característica de la LC; B) leishmaniosis mucocutánea; C) leishmaniosis cutánea difusa; D) PKDL; E) hepatoesplenomegalia debida a LV. Fuentes: A, Aguado y col., 2013; B, Chappuis y col., 2007; C y E, Gradoni y col., 2017.	8
Figura 3. Diferentes ciclos de leishmaniosis e interacción entre ellos. Fuente: modificado de Léger y Depaquit, 1999.	9
Figura 4. Distribución de la LV (A) y la LC (B) a nivel mundial. Los puntos azules indican puntos de incidencia o casos dentro de pequeños núcleos habitados. Fuente: modificado de Pigott y col., 2014.	10
Figura 5. Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i> . Fuente: modificado de Ruggiero y col., 2015; Mauricio, 2018.	12
Figura 6. Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i> . Fuente: modificado de la página web del Instituto de Investigación para el Desarrollo (<i>Institut de recherche pour le développement</i>) (http://leishmania.ird.fr/#). Las especies pertenecientes al Viejo Mundo se indican en color azul y las del Nuevo Mundo en violeta. Los nombres en negrita indican las especies patógenas para el ser humano. Los nombres entre comillas hacen referencia a nombre no oficiales sin descripciones formales; <i>Leishmania "siamensis"</i> y <i>Leishmania martiniquensis</i> también han sido encontradas en el Nuevo Mundo. Las especies sinónimas están señaladas con diferente número de (*) y (+). Subrayado: especies cuya clasificación no es definitiva.	13
Figura 7. Región del ADNr donde se localizan las dianas moleculares de las regiones ITS. Fuente: modificado de Van der Auwera y Dujardin, 2015.	15
Figura 8. Esquema de la configuración del minicírculo de kinetoplasto. Fuente: modificado de Van der Auwera y Dujardin, 2015.	17
Figura 9. Factores impulsores del cambio global en relación con los potenciales cambios en la situación de las VBD. Fuente: modificado de Sutherst, 2004.	18
Figura 10. Hembra y macho de flebotomo. Fuente: modificado de Bruce Alexandre (https://roddillon.com/dillons-sand-fly-research/)	22
Figura 11. Morfología de la cabeza y de las piezas bucales de un flebotomo. Fuente: modificado de Jobling y col., 1987; Léger y Depaquit, 1999.	22
Figura 12. Segmentos finales del abdomen de una hembra de flebotomo. Fuente: modificado de Léger y Depaquit, 1999.	23
Figura 13. Segmentos finales del abdomen de un macho de flebotomo. Fuente: modificado de Jobling y col., 1987.	23
Figura 14. Clasificación de las especies de flebotomos del Viejo y Nuevo Mundo. Fuente: modificado de Akhoundi y col., 2016.	25
Figura 15. Distribución de los principales géneros de flebotomos. La distribución del género <i>Lutzomyia</i> se ha considerado según Young y Duncan, 1994. Fuente: modificado de Léger y Depaquit, 1999.	26

Figura 16. Trampa de luz tipo CDC. Fuente: Laboratorio de Entomología Médica (Centro Nacional de Microbiología-Instituto de Salud Carlos III) (LEM (CNM-ISCIII)).	28
Figura 17. Trampas adhesivas colocadas a lo largo de una zona de muestreo. Fuente: LEM (CNM-ISCIII).	28
Figura 18. Trampa de emergencia para la captura de flebotomos adultos recién emergidos fijada al suelo en la que se dispone una fina tela que evite que los flebotomos escapen. Está protegida con una cubierta que la preserva de la acción del sol y la lluvia. Fuente: modificado de Casanova y col., 2013.	29
Figura 19. Ciclo de vida de los flebotomos. Fuente: modificado de Depaquit y Léger, 1999; LEM (CNM-ISCIII); imagen central: página web de la Universidad de Liverpool (http://pcwww.liv.ac.uk/leishmania/life_cycle_habitats.htm).	31
Figura 20. Apareamiento de <i>P. perniciosus</i> . Fuente: LEM (CNM-ISCIII).	32
Figura 21. Representación (A) y fotografía (B) del tubo digestivo de un flebotomo. Fuente: esquema modificado de Jobling y col., 1987; fotografía, LEM (CNM, ISCIII)	34
Figura 22. Estómago de flebotomo en el que se observa la sangre ingerida rodeada por la MP. Fuente: modificado de Sadlova y Volf (Vdorak y col., 2018).	34
Figura 23. Hembras de <i>P. perniciosus</i> alimentándose sobre un conejo. Fuente: modificado de Jiménez y col., 2014.	35
Figura 24. Representación de los tres grupos de <i>Leishmania</i> según el lugar de desarrollo del parásito dentro del tubo digestivo del flebotomo. Fuente: modificado de Kaufer y col., 2017.	35
Figura 25. Desarrollo de <i>Leishmania</i> dentro del aparato digestivo de un flebotomo. Tras la ingesta de células infectadas con amastigotes de <i>Leishmania</i> a partir de un hospedador infectado, estos amastigotes se diferencian en promastigotes procíclicos, los cuales se multiplican. Estos promastigotes procíclicos se convierten en nectomonas, que escapan de la MP y se adhieren a las microvellosidades en el tubo digestivo medio antes de pasar a la parte anterior del tubo digestivo y llegar a la válvula estomodal, donde se diferencian en leptomonas. Aquí, las leptomonas se diferencian en haptomonas, que se unen a la VE, o en promastigotes metacíclicos que son la forma infectiva para los mamíferos y que se transmiten cuando la hembra del flebotomo vuelve a ingerir sangre de un hospedador vertebrado. Am: amastigotes; Le: leptomonas; Ne: nectomonas; Ha: haptomonas; Me: promastigotes metacíclicos; PSG: gel secretado por promastigotes leptomonas. Fuente: Bates, 2007; Sunter y Gull, 2017.	37
Figura 26. Esquema propuesto por Serafim y col., 2018 en el que las ingestas de sangre posteriores a una primera ingesta infectiva promueven el establecimiento de <i>Leishmania</i> al desencadenar la diferenciación inversa de los promastigotes metacíclicos en retroleptomonas multiplicativas que amplifican la carga parasitaria en el tubo digestivo del flebotomo. Fuente: modificado de Serafim y col., 2018.	38
Figura 27. Especies de flebotomos citadas en España.	54
Figura 28. Cronología de la descripción de las diferentes especies de flebotomos en España considerando la revisión realizada por León-Sanz y col., 1998.	54

Figura 29. Distribución de las especies de flebotomos presentes en España, sin incluir <i>P. longicuspis</i> ni <i>P. riouxi</i> . Fuente: modificado de Gil-Collado y col., 1989 y actualizado a partir de Barón-López, 2014; Bravo-Barriga y col., 2016; Morillas-Márquez y col., 2016.	56
Figura 30. Distribución espacial de los casos de LV según la georreferenciación de sus domicilios en la CM, desde julio de 2009 hasta junio de 2014. Fuente: modificado de Ordobás y col., 2017.	59
Figura 31. Comparación de la evolución del número de casos de leishmaniosis asociados al brote y los detectados en el resto de la CM, desde 2001 a abril de 2018. Fuente: RENAVE, EDO, CM.	60
Figura 32. Curva epidemiológica según las formas de presentación y por mes de inicio de síntomas (actualizada a 05/04/2018). ↓ Mes con el mayor número de ★ casos; periodo en 2013 en el que no se registraron casos de LV. Fuente: RENAVE, EDO.	60
Figura 33. Distribución de casos y principales infraestructuras viarias presentes en la zona del brote. Fuente: modificado de Aránguez y col., 2014.	62
Figura 34. Municipio de Fuenlabrada. A) A mediados del siglo XX; B) en la actualidad. Fuente: páginas web Memorias de Fuenlabrada y del Ayuntamiento de Fuenlabrada (http://memoriasfuenlabrada.blogspot.com/search/label/casco%20antiguo ; http://www.ayto-fuenlabrada.es/index.do?MP=3&MS=31&MN=2&TR=C&IDR=84).	63
Figura 35. Vista panorámica del Parque Forestal de Bosquesur en el que se puede apreciar la cercanía de las viviendas del municipio de Fuenlabrada al parque. Fuente: LEM (CNM-ISCIII).	64
Figura 36. Presencia de conejos y liebres en el área afectada por el brote de leishmaniosis en el suroeste de la CM. A) Vivares de conejos registrados en la zona afectada por el brote de leishmaniosis; B) registro de avistamientos de liebres en la zona afectada por el brote de leishmaniosis. Fuente: modificado de Aránguez e Iriso, 2017.	65
Figura 37. Métodos de captura de lagomorfos. A) Redes para captura de liebres; B) jaula-trampa utilizada para la captura de conejos. Fuente: modificado de Dirección General de Agricultura y Ganadería y Dirección General del Medio Ambiente. Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A., 2017.	67
Figura 38. Tríptico “La leishmaniasis, cómo protegerte” publicado por la CM, el Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid (COLVEMA) y los ayuntamientos de Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid. Fuente: página web del COLVEMA (https://www.colvema.org/pdf/folleto/Folleto-Leishmaniosis-2012.pdf).	68

Material y Métodos

Figura 39. Plan del proyecto del Parque Forestal de Bosquesur donde se muestran las diferentes infraestructuras viarias de la zona. Fuente: página web de la CM (http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadname1=Content-Disposition&blobheadervalue1=filename%3DBosquesur.pdf).....	76
---	----

Figura 40. Mapa de la zona donde se ha llevado a cabo el estudio entomológico y localización de las estaciones de muestreo. Fuente: modificada de Google Maps.....	77
Figura 41. <i>Data logger</i> utilizado para el registro de la temperatura y humedad relativa en cada punto de muestreo. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	78
Figura 42. Muestreo con trampas adhesivas. A) Recipiente de plástico donde se conservan las hojas de papel impregnadas con aceite de ricino hasta su colocación. B) Momento de recogida y almacenamiento de una trampa adhesiva para su conservación y transporte al laboratorio. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	80
Figura 43. Colocación de las trampas adhesivas en la estación ATE junto a los muros del recinto en zonas de vegetación (A) y con restos de madera y escombros (B) . Fuente: LEM (CNM, ISCIII).....	80
Figura 44. En la estación BOS las trampas se situaron en rejillas que cubren los aparatos de aire acondicionado (A) , taludes con vegetación y madrigueras de conejos (B) , rejillas de alcantarillado (C) y tajeas (D) . Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	81
Figura 45. Localización de las trampas adhesivas en la estación JIC. A) Junto a una caseta de ladrillo. B) A lo largo del muro colindante al Parque Forestal de Bosquesur. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	81
Figura 46. Ubicación de las trampas adhesivas en la estación POL: A) zonas con vegetación; B) en composteras; C) y D) alrededor de una caseta junto a la que se almacenaban restos de madera. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).....	82
Figura 47. Procesamiento de los ejemplares capturados con las trampas adhesivas. A) Manipulación de una trampa adhesiva para retirar con un pincel los flebotomos adheridos al papel; B) preparaciones de hembras de flebotomo montadas en medio de Hoyer. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	82
Figura 48. Características taxonómicas de la espermateca, cibario y armadura faríngea de las hembras de flebotomo de las especies presentes en la Península Ibérica. A) Cibario y espermateca de <i>S. minuta</i> ; B) espermateca de <i>P. mascitti</i> ; C) espermateca de <i>P. ariasi</i> ; D) espermateca de <i>P. perniciosus</i> ; E) espermateca de <i>P. langeroni</i> ; F) faringe y espermateca de <i>P. alexandri</i> ; G) faringe y espermateca de <i>P. chabaudi</i> ; H) faringe y espermateca de <i>P. sergenti</i> ; I) faringe y espermateca de <i>P. papatasi</i> . Fuente: modificado de Gállego Berenguer y col., 1992; Martínez Ortega y col., 1996.	83
Figura 49. Características taxonómicas de la genitalia de los machos de flebotomos de las especies existentes en la Península Ibérica. A) <i>S. minuta</i> ; B) <i>P. mascitti</i> ; C) <i>P. ariasi</i> ; D) <i>P. perniciosus</i> ; E) <i>P. langeroni</i> ; F) <i>P. alexandri</i> ; G) <i>P. chabaudi</i> ; H) <i>P. sergenti</i> ; I) <i>P. papatasi</i> . Fuente: modificado de Gállego Berenguer y col., 1992; Martínez Ortega y col., 1996.	84
Figura 50. Trampas de luz tipo CDC en las que se señalan los diferentes componentes. A) Trampa de luz colgada de un árbol en el punto de muestreo JIC2; B) trampa de luz colocada en el punto de muestreo POL2. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	85
Figura 51. Localización de las trampas de luz tipo CDC en las cuatro estaciones de muestreo: A) ATE; B) BOS; C) JIC; D) POL. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).....	86

Figura 52. Esquema del procesamiento de las hembras y machos capturados mediante trampas de luz tipo CDC. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	87
Figura 53. Proceso de disección del tubo digestivo de una hembra de flebotomo bajo microscopio estereoscópico. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	88
Figura 54. Observación del tubo digestivo bajo microscopio de contraste de fases para detectar la presencia de formas flageladas. A) Tubo digestivo infectado con promastigotes de <i>Leishmania</i> observado a un aumento de 100X; B) Detalle a un aumento de 400X de la VE de un flebotomo bloqueada por la presencia de un elevado número de promastigotes. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	88
Figura 55. Esquema del proceso de lavado en placas de ELISA de los flebotomos. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	93
Figura 56. Disección de una hembra de flebotomo para la posterior extracción de ADN. A) Eliminación de patas y alas; B) separación de la cabeza y la genitalia; C) el tórax y el abdomen se pasan al tubo con tampón de lisis. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	93
Figura 57. Fases del proceso de digestión de la sangre ingerida por un flebotomo: 1) abdomen sin sangre; 2) abdomen inmediatamente después de la ingesta de sangre; 3) 24 h postingesta; 4) 48 h postingesta; 5) 72 h postingesta; 6) 96h postingesta; 7) abdomen tras la digestión total de la sangre ingerida. Fuente: modificado de Dolmatova y Demina, 1971.	94

Resultados

Figura 58. Flebotomos adheridos a trampas adhesivas colocadas en rejillas de aire acondicionado (A) y clavadas en el suelo mediante una varilla de madera (B) . Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	105
Figura 59. Número de flebotomos capturado mediante trampas adhesivas en cada estación en los tres años de muestreo.	1066
Figura 60. Evolución de la densidad (flebotomos/m ²) global de las especies de flebotomos capturadas mediante trampas adhesivas a lo largo de los tres años del estudio, atendiendo a la superficie muestreada en cada uno de ellos (31,84 m ² en 2012, 31,6 m ² en 2013 y 31,84 m ² en 2014).	107
Figura 61. Superficie muestreada (m ²) en cada estación a lo largo de cada año.	108
Figura 62. Densidad de <i>P. perniciosus</i> (<i>P. per</i>) y <i>S. minuta</i> (<i>S. min</i>) en cada estación de muestreo a lo largo de los tres años del estudio. (↓): Periodo de muestreo en el que la densidad de <i>S. minuta</i> fue mayor a la de <i>P. perniciosus</i>	108
Figura 63. Detalle de las genitales de <i>P. perniciosus</i> observadas bajo microscopio de contraste de fases a un aumento total de 400x. A) Genitalia de una hembra donde se aprecian las espermatecas; B) región abdominal terminal de un macho en la que se pueden observar las estructuras del aparato genital externo. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	109
Figura 64. Macho de <i>S. minuta</i> montado en medio de Hoyer para su observación bajo microscopio de contraste de fases (aumento total de 100x). Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	110
Figura 65. Hembra de <i>S. minuta</i> capturada mediante trampa adhesiva y montada en medio de Hoyer para su identificación taxonómica bajo microscopio de contraste de fases (aumento total de 100x). A) Región terminal del abdomen de	

una hembra de <i>S. minuta</i> donde se aprecia la espermateca; B) detalle de la cabeza donde se puede apreciar el cibario armado característico de esta especie. Fuente: LEM (CNM, ISCIII).	110
Figura 66. Número de hembras (♀) y machos (♂) de <i>P. perniciosus</i> y <i>S. minuta</i> capturados en cada estación y periodo de muestreo.	111
Figura 67. Flebotomos capturados mediante trampas de luz tipo CDC en cada estación de muestreo a lo largo de los tres años del estudio.	112
Figura 68. Número de ejemplares de <i>P. perniciosus</i> capturado a lo largo de los tres años del estudio en los dos puntos de las estaciones ATE y BOS (A) y en las estaciones JIC y POL (B).	114
Figura 69. Número de ejemplares de <i>S. minuta</i> capturado a lo largo de los tres años del estudio en los dos puntos de muestreo de ATE y BOS (A) y de JIC y POL (B).	115
Figura 70. Abundancia relativa de <i>P. perniciosus</i> (<i>P. per</i>) y <i>S. minuta</i> (<i>S. min</i>) en cada estación a lo largo de cada año de muestreo.	117
Figura 71. Número de hembras (♀) y machos (♂) de <i>P. perniciosus</i> en cada estación durante los tres periodos de muestreo.	118
Figura 72. Hembras (♀) y machos (♂) de <i>P. perniciosus</i> capturados en cada punto de muestreo de las cuatro estaciones a lo largo de los tres años.	119
Figura 73. Número de hembras (♀) y machos (♂) de <i>S. minuta</i> capturado en cada estación a lo largo del estudio.	120
Figura 74. Número de hembras (♀) y machos (♂) de <i>S. minuta</i> capturado en cada punto de las cuatro estaciones de muestreo a lo largo del estudio.	121
Figura 75. Temperatura media (°C) registrada mensualmente a lo largo de los tres periodos de muestreo.	122
Figura 76. Temperatura media registrada en las cuatro estaciones cada año de muestreo. A) 2012, B) 2013, C) 2014.	124
Figura 77. Evolución de los valores medios de temperaturas máximas registrados en cada periodo de muestreo.	126
Figura 78. Temperatura máxima media registrada en cada estación durante cada periodo de muestreo. A) 2012, B) 2013, C) 2014.	127
Figura 79. Evolución de los valores de temperatura mínima registrados a lo largo de los tres periodos de muestreo.	128
Figura 80. Valores medios de temperatura mínima registrados en cada estación durante cada periodo de muestreo. A) 2012, B) 2013, C) 2014.	130
Figura 81. Evolución de los valores de humedad relativa media a lo largo de cada periodo de muestreo.	131
Figura 82. Valores de humedad relativa media registrados en las estaciones durante cada año de muestreo. A) 2012, B) 2013, C) 2014.	133
Figura 83. Evolución de los valores de humedad relativa máxima a lo largo de cada periodo de muestreo.	135
Figura 84. Valores medios de humedad relativa máxima registrados en las estaciones a lo largo de cada año de muestreo. A) 2012, B) 2013, C) 2014.	136
Figura 85. Evolución mensual de los registros de humedad relativa mínima en cada periodo de muestreo.	137

Figura 86. Valores medios de humedad relativa mínima registrada en las estaciones a lo largo de cada año de muestreo. A) 2012, B) 2013, C) 2014.	138
Figura 87. Evolución de las capturas mediante trampas adhesivas de <i>P. perniciosus</i> (A) y <i>S. minuta</i> (B) a lo largo de los meses de muestreo en cada año.	140
Figura 88. Evolución del número de hembras y de machos capturado con trampas adhesivas de <i>P. perniciosus</i> (A) y <i>S. minuta</i> (B) a lo largo de cada año del estudio.	141
Figura 89. Superficie muestreada (m ²) mensualmente a lo largo de los tres periodos de estudio.	142
Figura 90. Densidad total (flebotomos/m ²), densidad de <i>P. perniciosus</i> y densidad de <i>S. minuta</i> calculadas para cada mes durante los tres años de muestreo. A) 2012, B) 2013, C) 2014.	143
Figura 91. Evolución de las capturas mensuales de <i>P. perniciosus</i> (A) y <i>S. minuta</i> (B) obtenidas mediante trampas de luz cada año de muestreo.	145
Figura 92. Evolución del número de hembras y machos de <i>P. perniciosus</i> (A) y <i>S. minuta</i> (B) capturado mediante trampas de luz a lo largo de cada año del estudio.	146
Figura 93. Número de ejemplares de <i>P. perniciosus</i> y <i>S. minuta</i> capturado mensualmente mediante trampas adhesivas durante cada periodo de muestreo, en relación con la temperatura y humedad relativa registradas. A) 2012, B) 2013, C) 2014. T ^a (°C), temperatura en grados Celsius; HR, humedad relativa.	147
Figura 94. Número de ejemplares de <i>P. perniciosus</i> y <i>S. minuta</i> capturado mensualmente mediante trampas de luz en cada periodo de muestreo, en relación con la temperatura y humedad relativa registradas. A) 2012, B) 2013, C) 2014. T ^a (°C), temperatura en grados Celsius; HR, humedad relativa.	148
Figura 95. Evolución de las tasas de infección en <i>P. perniciosus</i> para cada estación a lo largo de los tres periodos de muestreo. A) 2012, B) 2013, C) 2014.	156
Figura 96. Alineamiento parcial en el que se muestran las diferencias en las regiones polimórficas de los fragmentos de las secuencias ITS1 e ITS2 entre diferentes genotipos de <i>L. infantum</i> (genotipo Lombardi (AJ000295); genotipo A (AJ634341); genotipo A/B (AJ634355); genotipo B (AJ000288); genotipo E (AJ634361); genotipo F (AJ634370)) y la secuencia del primer aislado caracterizado en este estudio (ATE1FL2).	158
Figura 97. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para la detección de <i>L. infantum</i> en flebotomos. A) Amplificación del fragmento de ADNk. M1, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, control negativo de PCR; 2, blanco de extracción; 3-11, ADN de hembras de <i>P. perniciosus</i> ; 12, control positivo (10 pg de ADN de promastigotes de <i>L. infantum</i> JPCM5); M2, marcador de FiX174/ <i>Hinf</i> I (Biotools®). B) Amplificación del fragmento de <i>cpb</i> . M1, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, control negativo de PCR; 2-12, ADN de hembras de <i>P. perniciosus</i> ; 13, control positivo (100 pg de ADN de promastigotes de <i>L. infantum</i> JPCM5); M2, marcador de 1 kb (Biotools®). C) Amplificación del fragmento de ITS1. M1, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, control negativo de PCR; 2-9, ADN de hembras de <i>P. perniciosus</i> ; 10, control positivo (1 ng de ADN de promastigotes de <i>L. infantum</i> JPCM5); M2, marcador de 100 pb (Biotools®).	159

- Figura 98.** Porcentaje de hembras con sangre positivas a *L. infantum* por estación durante cada periodo de muestreo. 160
- Figura 99.** Porcentaje de hembras sin sangre positivas a *L. infantum* en cada estación a lo largo de los tres periodos de muestreo..... 161
- Figura 100.** Gráfico de adquisición de fluorescencia obtenido con las diluciones de promastigotes de *L. infantum* (10^7 promastigotes/ml – 1 promastigote/ml). CNA, control negativo sin ADN; CN, control negativo. 162
- Figura 101.** **A)** Curva patrón obtenida con las diluciones seriadas 1:10 de promastigotes de *L. infantum* (10^7 promastigotes/ml - 1 promastigote/ml). **B)** Curva patrón obtenida con las diluciones 1:10 de promastigotes de *L. infantum* (10^7 promastigotes/ml - 1 promastigote/ml) a las que se añadieron 30 ng de ADN de flebotomos procedentes de la colonia establecida en el LEM (CNM-ISCIII). Ct, ciclo umbral; R^2 , coeficiente de determinación. 163
- Figura 102.** Distribución de la carga parasitaria de *L. infantum* en las hembras analizadas de cada periodo de muestreo. (●) 2012, (■) 2013, (▲) 2014..... 164
- Figura 103.** Representación de los resultados del análisis mediante qPCR de hembras de flebotomo. **A)** Gráfico de adquisición de fluorescencia donde se diferencian entre hembras positivas y negativas a *L. infantum*, y controles positivos y negativos. **B)** Concentración de la carga parasitaria (parásito/reacción) de las muestras en relación a los controles positivos. Valores obtenidos en la reacción de qPCR: coeficiente de correlación ($R=1$), coeficiente de determinación ($R^2=1$), pendiente ($M=-3,339$), compensación ($B=31,765$), eficiencia (0,99). Ct, ciclo umbral. 164
- Figura 104.** Distribución de las hembras analizadas con sangre (■) y sin sangre (●) en relación a la carga parasitaria determinada mediante qPCR. 165
- Figura 105.** Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de la región ITS1 en la que se observan las bandas de ≈ 480 pb (flechas negras). **A)** 1, control negativo de PCR; 2-9, ADN de hembras de *P. perniciosus*; 10, control positivo (1 ng de ADN de cultivos promastigotes de *L. infantum*). **B)** 1, control negativo de PCR; 2-12, ADN de hembras de *P. perniciosus*; 13, control positivo (1 ng de ADN de cultivos promastigotes de *L. infantum*). **C)** 1-12, ADN de hembras de *P. perniciosus*; 13, control positivo (1 ng de ADN de cultivos promastigotes de *L. infantum*). M1, marcador de 100 pb (Biotools®); M2, marcador de 1 kb (Biotools®)..... 166
- Figura 106.** Electroforesis en gel de agarosa tras la amplificación de ARNr SSU en las que se observan bandas de ≈ 940 pb. **A)** 1, control negativo de PCR; 2-4, ADN de hembras de *P. perniciosus*; 5, control positivo (1 ng de ADN de cultivos promastigotes de *L. infantum*). **B)** 1, control negativo de PCR; 2-8, ADN de hembras de *P. perniciosus*; 9, control positivo (1 ng de ADN de cultivos promastigotes de *L. infantum*). M1, marcador de 100 pb (Biotools®); M2, marcador de 1 kb (Biotools®). 166
- Figura 107.** Alineamiento parcial donde se señalan las diferencias entre los fragmentos de la región ITS1 de *T. nabiasi* obtenidos en este estudio y los fragmentos anotados por Merino-Espinosa y col., 2016..... 169
- Figura 108.** Árbol filogenético con las secuencias ITS1 de *T. nabiasi* y de otros tripanosomátidos anotadas en la base de datos Genbank® (números de

- acceso entre paréntesis), mediante análisis de máxima verosimilitud (log= -1849,0314). Como taxón externo (*outgroup*) se incluyó una secuencia de *Chritidia fasciculata*. Las longitudes de las ramas, medidas en el número de sustituciones por sitio, se indican junto a cada rama. Los números rodeados por un círculo indican los valores de bootstrap (%). 170
- Figura 109.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias ARNr SSU de *T. nabiasi* y secuencias de otros tripanosomátidos anotadas en la base de datos Genbank® (números de acceso entre paréntesis), mediante análisis de máxima verosimilitud (log= -1524,8882). Se incluyó como taxón externo (*outgroup*) una secuencia de *Herpetomonas* sp. Las longitudes de las ramas, medidas en el número de sustituciones por sitio, se indican junto a cada rama. Los números rodeados por un círculo indican los valores de bootstrap (%). 170
- Figura 110.** Origen de la sangre ingerida por las hembras de *P. perniciosus* a lo largo de los tres años del estudio. NI: no identificada..... 172
- Figura 111.** Origen de la sangre ingerida por las hembras de *P. perniciosus* en cada estación de muestreo a lo largo de los tres años del estudio. 173
- Figura 112.** Origen de la sangre ingerida por hembras de *P. perniciosus* en cada una de las estaciones durante los diferentes periodos de muestreo. NI= no identificada. 1733
- Figura 113.** Fragmentos de la secuencia de 359 pb del gen *cytb* tras el estudio de los sitios de restricción con la enzima *HaeIII*. a) Fuentes de alimentación de las hembras de flebotomo de Girona y Menorca. (*) Secuencias KM102050.1, KM213250.1 y KJ154700.1; (**) secuencias JX567811.1, KF977846.1 y AJ971339.1. 176
- Figura 114.** Fragmentos de la secuencia de 359 pb del gen *cytb* tras el estudio de los sitios de restricción con la enzima *HinfI*. a) Fuentes de alimentación de las hembras de flebotomo de Girona y Menorca. (*) Secuencias KM102050.1, KM213250.1 y KJ154700.1; (**) secuencias JX567811.1, KF977846.1 y AJ971339.1; (***) GU120393.1 y FM250715.1. 176
- Figura 115.** Patrón de bandas obtenido tras la digestión con el enzima de restricción *HaeIII* de los productos amplificados del gen *cytb*. **A)** M1, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, *O. cuniculus* (HQ596486.1); 2, 4 y 5, *O. cuniculus* (HG810791.1); 3, *O. cuniculus* (FM205927.1); 6, *Homo sapiens*; 7, *L. granatensis*; 8, *L. timidus**; M2, marcador de 50 pb (Takara). **B)** M, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, *O. aries*/*H. sapiens*; 2, *H. sapiens*; 3, *O. aries*. **C)** M1, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, *O. aries*; 2-4: sangre mixta *O. aries*/*C. hircus*; 5, *C. hircus*; M2, marcador de 50 pb (Takara). D) 1, *F. catus*; 2, *C. familiaris*; 3, *E. caballus*; 4, *G. gallus*; M, marcador de 100 pb (Biotools®). *Introgresión de ADN mitocondrial de *L. timidus* en el genoma de *L. granatensis*. 177
- Figura 116.** Patrón de bandas obtenido tras la digestión con el enzima de restricción *HinfI* de los productos amplificados de *cytb*. **A)** M, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, *O. cuniculus* (HQ596486.1); 2, 4 y 7, *O. cuniculus* (HG810791.1); 3, *O. cuniculus* (FM205927.1); 5, *H. sapiens*; 6, *L. granatensis*; 8, *L. timidus**; 9, *F. catus*; 10, *C. familiaris*. **B)** M, marcador de 100 pb (Biotools®); 1-3, sangre mixta *O. aries*/*C. hircus*; 4, *O. aries*; 5: *C. hircus*. **C)** M, marcador de 100 pb (Biotools®); 1, *E. caballus*; 2, *G. gallus*. *Introgresión de ADN mitocondrial de *L. timidus* en el genoma de *L. granatensis*. 178

Figura 117. Alineamiento de las secuencias ITS de los aislados a partir de flebotomos capturados en el periodo de muestreo 2012. Genotipo Lombardi (AJ000295); genotipo A (AJ634341); genotipo A/B (AJ634355); genotipo B (AJ000288); genotipo E (AJ634361); genotipo F (AJ634370).	259
Figura 118. Alineamiento de las secuencias ITS de los aislados a partir de flebotomos capturados en el periodo de muestreo 2013. Genotipo Lombardi (AJ000295); genotipo A (AJ634341); genotipo A/B (AJ634355); genotipo B (AJ000288); genotipo E (AJ634361); genotipo F (AJ634370).	262
Figura 119. Alineamiento de las secuencias ITS de los aislados a partir de flebotomos capturados en el periodo de muestreo 2014. Genotipo Lombardi (AJ000295); genotipo A (AJ634341); genotipo A/B (AJ634355); genotipo B (AJ000288); genotipo E (AJ634361); genotipo F (AJ634370).	271

10.3. Índice de tablas

Introducción

Tabla 1. Distribución de los casos según forma de presentación, por temporada epidemiológica de inicio de síntomas y municipio de residencia (actualizada a 05/04/2018). Fuente: RENAVE, EDO.	61
---	----

Material y Métodos

Tabla 2. Georreferenciación y altitud de cada punto de muestreo.	78
Tabla 3. Horarios de la puesta de sol y del amanecer durante los días de muestreo.	79
Tabla 4. Cebadores utilizados en la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2.	90
Tabla 5. Condiciones de la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2.	91
Tabla 6. Condiciones de la amplificación del fragmento de 120 pb de ADNk.	95
Tabla 7. Condiciones de la reacción de amplificación del gen <i>cpb</i>	95
Tabla 8. Condiciones de la amplificación del fragmento ARNr SSU.	96
Tabla 9. Cebadores internos diseñados para la secuenciación de la región ITS1 y ARNr SSU.	96
Tabla 10. Tripanosomátidos incluidos en el estudio filogenético (A) de la región ITS y (B) de la región ARNr SSU, y su nº de acceso en la base de datos del Genbank®.	97
Tabla 11. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento conservado de 359 pb del gen <i>cytb</i> de vertebrados.	99
Tabla 12. Condiciones de la reacción de amplificación del fragmento de 359 pb del gen <i>cytb</i>	100

Resultados

Tabla 13. Número de ejemplares capturado de cada especie de flebotomo en cada estación de muestreo durante los tres años de estudio.	106
--	-----

Tabla 14. Número de ejemplares de cada especie capturado mediante trampas de luz tipo CDC en cada estación de muestreo.	112
Tabla 15. Análisis de las diferencias anuales en las capturas de <i>P. perniciosus</i> entre los puntos de muestreo dentro de cada estación (test no paramétrico de Wilcoxon). (*): $p < 0,05$	113
Tabla 16. Análisis de las diferencias anuales en las capturas de <i>S. minuta</i> entre los puntos de muestreo de cada estación (test no paramétrico de Wilcoxon). (*): $p < 0,05$	115
Tabla 17. Capturas de <i>P. perniciosus</i> durante cada noche en los dos puntos de muestreo de cada estación a lo largo de los tres periodos del estudio. N1=primera noche; N2= segunda noche.	116
Tabla 18. Valores p obtenidos tras el análisis de las temperaturas medias registradas mensualmente en las 4 estaciones de muestreo a lo largo del estudio (test no para métrico de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$	123
Tabla 19. Análisis de las diferencias entre las temperaturas medias registradas mensualmente cada año en las estaciones (test de comparación múltiple de Dunn). (*): $p < 0,05$	123
Tabla 20. Valores de temperatura media registrados durante cada noche en los dos puntos de muestreo de cada estación durante los tres periodos del estudio. N1: primera noche; N2: segunda noche.	125
Tabla 21. Análisis de las diferencias en los valores medios de temperatura máxima mensuales entre los tres periodos de muestreo (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$	126
Tabla 22. Valores p resultantes tras el análisis de las diferencias entre las temperaturas máximas medias registradas mensualmente, comparadas por años (test de comparación múltiple de Dunn). (*): $p < 0,05$	126
Tabla 23. Resultados de los valores p tras analizar las diferencias entre las temperaturas máximas promedio mensuales de las estaciones (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$	126
Tabla 24. Análisis de las diferencias en los valores medios de temperatura mínima mensuales entre los tres periodos de muestreo (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$	129
Tabla 25. Valores p obtenidos tras el análisis de las diferencias entre las temperaturas mínimas registradas mensualmente en las estaciones, comparando los tres años de muestreo (test de comparación múltiple de Dunn). (*): $p < 0,05$	129
Tabla 26. Valores r resultantes tras el estudio estadístico de las diferencias en las temperaturas mínimas promedio registradas mensualmente en las estaciones a lo largo de los tres periodos de muestreo (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$	129
Tabla 27. Resultado de los valores p tras el análisis de las diferencias entre la humedad relativa media registrada mensualmente a lo largo de los tres periodos de muestreo (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$	132
Tabla 28. Valores p obtenidos tras estudiar las diferencias entre los valores de humedad relativa media registrados mensualmente en las estaciones, durante cada periodo de muestreo (test de comparación múltiple de Dunn). (*): $p < 0,05$. ..	132

Tabla 29. Valores de humedad relativa media registrada durante cada noche en los puntos de muestreo de cada estación a lo largo del estudio. N1: noche 1; N2: noche 2.....	134
Tabla 30. Valores p obtenidos tras analizar los datos promedio de humedad relativa máxima registrados mensualmente entre cada periodo de muestreo (test de comparación múltiple de Dunn). (*): $p < 0,05$	135
Tabla 31. Valores p resultantes tras el análisis de las diferencias en la humedad relativa máxima registrada mensualmente en las estaciones a lo largo de cada periodo (test no paramétrico de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$	135
Tabla 32. Resultado de los valores p tras estudiar las diferencias en los datos promedio de humedad relativa mínima registrados mensualmente entre de cada periodo de muestreo (test de comparación múltiple de Dunn). (*): $p < 0,05$. ..	137
Tabla 33. Número de flebotomos capturado cada mes durante los tres periodos de muestreo.....	139
Tabla 34. Análisis de las diferencias entre las densidades mensuales obtenidas a lo largo del muestreo (prueba de Kruskal-Wallis). (*): $p < 0,05$	142
Tabla 35. Valores p obtenidos tras el análisis de las diferencias en las densidades mensuales de <i>P. perniciosus</i> (<i>P. per</i>) y <i>S. minuta</i> (<i>S. min</i>) de cada periodo de muestreo (prueba de comparación múltiple de Dunn). (*): $p < 0,05$	142
Tabla 36. Número de flebotomos capturado mensualmente mediante trampas de luz a lo largo de los tres periodos de muestreo.	144
Tabla 37. Relación del número total de flebotomos capturado frente a los valores de temperatura media, máxima y mínima registrados en cada periodo de muestreo (test de correlación de Spearman).	149
Tabla 38. Relación de los flebotomos capturados mediante trampas adhesivas con las temperaturas medias, máximas y mínimas registradas en cada periodo de muestreo (test de correlación de Spearman).	150
Tabla 39. Relación de hembras y machos de <i>P. perniciosus</i> y <i>S. minuta</i> capturados mediante trampas adhesivas con los valores de temperatura media, máxima y mínima registrados a lo largo del estudio entomológico (test de correlación de Spearman).	150
Tabla 40. Relación de los flebotomos capturados mensualmente mediante trampas de luz y las temperaturas medias, máximas y mínimas registradas en cada periodo de muestreo (test de correlación de Spearman).	151
Tabla 41. Relación de hembras y machos de <i>P. perniciosus</i> y <i>S. minuta</i> capturados mediante trampas de luz con los valores de temperatura media, máxima y mínima registrados a lo largo del estudio (test de correlación de Spearman).	151
Tabla 42. Relación entre los flebotomos capturados con respecto a los valores registrados de humedad relativa (HR) media, máxima y mínima durante cada año de muestreo (test de correlación de Spearman). (*): $p < 0,05$	152
Tabla 43. Relación entre los flebotomos capturados mediante trampas adhesivas y los valores de humedad relativa (HR) media, máxima y mínima registrados en cada periodo (test de correlación de Spearman).	153
Tabla 44. Relación entre hembras y machos de <i>P. perniciosus</i> y <i>S. minuta</i> capturados con trampas adhesivas y los valores de humedad relativa (HR)	

media, máxima y mínima registrados a lo largo del estudio (test de correlación de Spearman).....	153
Tabla 45. Relación entre los flebotomos capturados mediante trampas de luz y los valores de humedad relativa (HR) media, máxima y mínima registrados en cada periodo de muestreo (test de correlación de Spearman).....	154
Tabla 46. Relación entre el número de hembras y machos de <i>P. perniciosus</i> y <i>S. minuta</i> capturados mediante trampas de luz y los valores de humedad relativa (HR) media, máxima y mínima registrados a lo largo del estudio (test de correlación de Spearman). (*): $p < 0,05$	154
Tabla 47. Media de los valores Ct y desviación estándar (DE) de cada una de las diluciones de promastigotes.	162
Tabla 48. Relación de ejemplares de <i>P. perniciosus</i> analizados mediante qPCR.....	163
Tabla 49. Estimación de la carga parasitaria de <i>L. infantum</i> en hembras de <i>P. perniciosus</i> mediante qPCR.....	163
Tabla 50. Número de repeticiones en las regiones poly TG y poly AT de las secuencias ITS1 de <i>T. nabiasi</i> obtenidas en este trabajo y las secuencias anotadas por Merino-Espinosa y col., 2016 (Nab-A, Nab-B, Nab-C y Nab-D).	168
Tabla 51. Número de hembras con sangre ingerida, identificada y no identificada, en cada periodo en las que se detectó <i>L. infantum</i> mediante PCR. NI=no identificada.	174
Tabla 52. Secuencias del gen <i>cytb</i> en los que fue necesaria la digestión con ambas enzimas de restricción para su identificación.....	175

10.4. Publicaciones

- ✦ Jiménez, M., **González, E.**, Iriso, A., Marco, E., Alegret, A., Fúster, F., Molina, R., 2013. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. Parasitol. Res., 112(7), 2453-9.
<https://doi.org/10.1007/s00436-013-3406-3>.
- ✦ Jiménez, M., **González, E.**, Martín-Martín, I., Hernández, S., Molina, R., 2014. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? Vet. Parasitol., 202 (3-4), 296-300.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.027>.
- ✦ **González, E.**, Gállego, M., Molina, R., Abras, A., Alcover, M.M., Ballart, C., Fernández, A., Jiménez, M., 2015. Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome *b* gene. Acta Trop., 152, 96-102.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.020>.
- ✦ Martín-Martín, I., Jiménez, M., **González, E.**, Eguiluz, C., Molina, R., 2015. Natural transmission of *Leishmania infantum* through experimentally infected *Phlebotomus perniciosus* highlights the virulence of *Leishmania* parasites circulating in the human visceral leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain. Vet. Res., 46:138.
<https://doi.org/10.1186/s13567-015-0281-1>.

- ✦ Alten, B., Maia, C., Afonso, MO., Campino, L., Jiménez, M., **González, E.**, Molina, R. y col., 2016. Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. PLOS Negl. Trop. Dis.,10 (2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004458>.
- ✦ **González, E.**, Álvarez, A., Ruiz, S., Molina, R., Jiménez, M., 2017. Detection of high *Leishmania infantum* loads in *Phlebotomus perniciosus* captured in the leishmaniasis focus of southwestern Madrid region (Spain) by real time PCR. Acta Trop. 171, 68-73.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.03.023>.
- ✦ Jiménez, M., Molina, R., Alvar, J., **González, E.**, Hernández, S., Martín-Martín, I., 2017. Methods in sand fly research. Madrid: Servicio de publicaciones de la Universidad de Alcalá de Henares. ISBN: 978-84-46978-28-1.
- ✦ Jiménez, M., **González, E.**, Martín-Martín, I., Hernández, S., Molina, R., 2017. Dinámica estacional, preferencias alimentarias y niveles de infección por *Leishmania infantum* en *Phlebotomus perniciosus*. En: Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. El papel de las liebres y los conejos como reservorios. Madrid: Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. ISBN: 978-84-541-3625-6.
- ✦ Molina, R., **González, E.**, Martín-Martín, I., Hernández, S., Jiménez, M., 2017. Xenodiagnóstico de la leishmaniosis: implicación de los lepidópteros en el ciclo selvático de *Leishmania infantum* en Bosquesur. En: Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid. El papel de las liebres y los conejos como reservorios. Madrid: Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. ISBN: 978-84-541-3625-6.
- ✦ **González, E.**, Jiménez, M., Hernández, S., Martín-Martín, I., Molina, R., 2017. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. Parasit. Vectors,10:368. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2309-z>.
- ✦ **González, E.**, Molina, R., Jiménez, M., 2018. Rabbit trypanosome detection in *Phlebotomus perniciosus* sand flies from the leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain. Acta Trop., 187, 201-206.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.011>.

Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain

Maribel Jiménez · Estela González · Andrés Iriso ·
Elisa Marco · Ana Alegret · Fernando Fúster ·
Ricardo Molina

Received: 5 February 2013 / Accepted: 15 March 2013 / Published online: 28 March 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract Since 2010, the number of cases of both human visceral leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis in south-western Madrid region (Spain) and more specifically in the town of Fuenlabrada has increased. Direct xenodiagnosis of leishmaniasis proved that hares (*Lepus granatensis*) from this focus are able to infect with *Leishmania infantum* colonized *Phlebotomus perniciosus*. To a better understanding of this focus of leishmaniasis, we conducted an entomological survey using CDC light traps, at the end of the seasonal transmission period of 2011 before the beginning of control measures of the disease, to study the phlebotomine sand flies species involved. Detection of *Leishmania* DNA in the sand flies captured was studied by kDNA-PCR and *cpb*-PCR. In addition, blood fed and gravid female *P. perniciosus* were analysed by a PCR based in vertebrate cytochrome *b* (*cyt b*) gene. Taxonomic identification of captured sand flies ($n=174$) as *P. perniciosus* ($n=171$) and *Sergentomyia minuta* ($n=3$) together with the analysis of blood feeding in ten sand flies that shows a high preference for hares ($n=6$), followed by humans ($n=3$), and cats ($n=1$) confirm a strong association between *P.*

perniciosus hares and humans in the focus. Moreover, 79 out of 135 (58.5 %) *P. perniciosus* were positive to *L. infantum* by PCR approaches. These data support the increase of human leishmaniasis cases in the area and the existence of an unusual sylvatic cycle alternative to the classical domestic one, where the dog is the main reservoir of *L. infantum*.

Introduction

In Spain, leishmaniasis is a zoonosis caused by *Leishmania infantum* and transmitted by phlebotomine sand flies belonging to the subgenus *Larroussius* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae); the dog being the main domestic reservoir (WHO 2010).

Leishmaniasis is endemic in rural, peri-urban, and suburban areas of Madrid region (central Spain). Only two sand fly species *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi* out of the seven described in this region are proven vectors of the parasite *L. infantum*, being its main vector *P. perniciosus* (Conesa Gallego et al. 1999; Gálvez et al. 2010).

Since 2010, a marked and unusual increase of human cases of both visceral and cutaneous leishmaniasis (VL and CL, respectively) is being observed in four municipalities of the southwestern Madrid region, where around 374 cases have been diagnosed until September 2012—of which 36.6 % are cases of visceral leishmaniasis—with an incidence rate of 21.54 cases/100,000 inhabitants. Only in the town of Fuenlabrada, 316 cases have been notified with an incidence rate of 52.99 cases/100,000 inhabitants (Suárez et al. 2012). The creation of a park adjacent to the urban area of the focus was expected to increase the hare population in this open space, and as a result of this, it has increased the population of the sand fly vectors. In fact, we have recently shown by direct

M. Jiménez (✉) · E. González · R. Molina (✉)
Unidad de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Centro
Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra.
Majadahonda-Pozuelo s/n,
28220 Majadahonda Madrid, Spain
e-mail: mjimenez@isci.iii.es
e-mail: rmolina@isci.iii.es

A. Iriso · F. Fúster
Subdirección General de Sanidad Ambiental y Epidemiología,
Dirección General de Ordenación e Inspección, Consejería
de Sanidad, Comunidad de Madrid, Madrid, Spain

E. Marco · A. Alegret
Concejalía de Salud, Consumo y Cooperación, Ayuntamiento
de Fuenlabrada, Madrid, Spain



Rapid Communication

Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain?



Maribel Jiménez*, Estela González, Inés Martín-Martín, Sonia Hernández, Ricardo Molina*

Unidad de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 January 2014
Received in revised form 24 March 2014
Accepted 26 March 2014

Keywords:
Phlebotomus perniciosus
Leishmania infantum
Oryctolagus cuniculus
Xenodiagnosis
Sylvatic cycles
Reservoir

ABSTRACT

Xenodiagnosis has previously proved that hares (*Lepus granatensis*) from a focus of leishmaniasis in the southwestern Madrid region (Spain) are infective to *Phlebotomus perniciosus*, the only vector in the area, thus playing a probable role as active reservoirs in a sylvatic transmission cycle linked to the usual domestic one. Although actions have been taken to reduce the population of this lagomorph, a high population of wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) is present in the area, which shows detectable anti-*Leishmania infantum* antibodies and a large number of individuals with DNA of this parasite. With the aim to elucidate the role of this lagomorph in the focus, xenodiagnosis studies carried out with wild rabbits captured in the area demonstrate that they are able to transmit *L. infantum* to *P. perniciosus*. Moreover, the study of blood meal preferences of *P. perniciosus* caught in the focus during and entomological survey shows strong evidence that rabbits are contributing to the maintenance of a high sand fly population in the area. These findings suggest that wild rabbits could play some role in *Leishmania* transmission.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In Spain, leishmaniasis is a zoonosis caused by *Leishmania infantum* with the dog as the main domestic reservoir although a number of wild mammals have been found infected (Marín Iniesta et al., 1982; Morillas Márquez et al., 1985; Fisa et al., 1999; Criado-Fornelio et al., 2000; Portús et al., 2002; Sobrino et al., 2008; Chitimia et al., 2011; Millán et al., 2011; Molina et al., 2012; Del Río et al., 2013; Ruiz-Fons et al., 2013).

From July 2009 to date, a leishmaniasis outbreak has occurring in the southwest of the Madrid region, Spain

(Antonίου et al., 2013; Arce et al., 2013) and has already accounted for more than 494 human cases in an area that comprises a population of approximately 500,000 inhabitants, leading to an increased incidence in the area from 2.44 before 2009 to 18.94 per 100,000 inhabitants in 2013. The majority of cases ($n = 398$) comes from the municipality of Fuenlabrada, with an incidence of 44.55 cases per 100,000 inhabitants (data provided by Autonomous Community of Madrid).

A preliminary inspection of the area revealed a large population of hares present in the newly constructed peri-urban green park suggesting that hares could sustain a high sand fly population in the area. In this sense, we have demonstrated for the first time that apparently healthy hares (*Lepus granatensis*) from the focus were able to infect *Phlebotomus perniciosus* by xenodiagnosis studies (Molina et al., 2012). This findings together with recent

* Corresponding authors. Tel.: +34 91 822 3674; fax: +34 91 509 7034.
E-mail addresses: mjimenez@isci.es (M. Jiménez), rmolina@isci.es (R. Molina).



Short communication

Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome *b* gene

Estela González^a, Montserrat Gállego^{b,c}, Ricardo Molina^a, Alba Abras^{b,c},
M. Magdalena Alcover^{b,c}, Cristina Ballart^{b,c}, Anna Fernández^b, Maribel Jiménez^{a,*}

^a Unidad de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

^b Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona (UB), Spain

^c ISGlobal, Barcelona Ctr. Int. Health Res. (CRESIB), Hospital Clínic—Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2015

Received in revised form 21 August 2015

Accepted 31 August 2015

Available online 3 September 2015

Keywords:

PCR-RFLP
sand fly
blood meal
cytochrome *b*

ABSTRACT

Leishmaniasis is a vector-borne disease transmitted by phlebotomine sand flies. Information about blood meal preferences in sand flies is essential to understand the epidemiology of the disease to adopt control measures. In previous studies, a polymerase chain reaction (PCR) of 359 bp fragment of the conserved gene cytochrome *b* (*cyt b*) and further sequencing were applied in the study of blood meal sources in sand flies collected in the area of a leishmaniasis outbreak in southwest Madrid, Spain, providing significant information about blood meal preferences in the focus.

In this work, a PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) targeting a fragment of 359 bp of vertebrate *cyt b* gene was developed. Restriction endonucleases *Hae*III and *Hinf*I generated specific patterns consistent with the blood meal sources found in sand flies. The protocol has been validated with twenty six engorged females collected in the field with CDC traps. Blood meals from nine vertebrates were identified based on PCR-*cyt b* and sequencing—human, dog, cat, horse, hare, rabbit, sheep, goat and chicken – and mixed blood meals (sheep/human; sheep/goat) – and successfully distinguished by PCR-RFLP. Therefore, this approach is an efficient and reliable alternative method to be applied in entomological surveys.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is a vector-borne disease caused by a trypanosomatid protozoan of the genus *Leishmania* (WHO 2010). In Spain it is caused by *Leishmania infantum*, using the vectors *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi* (Rioux et al., 1986). The dog is the main reservoir, although it has been demonstrated that other wild mammals can play an important role in the maintenance and transmission of the parasite (Molina et al., 2012; Del Río et al., 2013; Ruiz-Fons et al., 2013; Jiménez et al., 2014).

Although leishmaniasis in Spain is considered hypoendemic, some regions are more affected, like the Mediterranean coast and the center of Spain. Moreover, since 2010 an important increase of the disease in urban areas of southwest Madrid has been detected. Actually, one of the areas studied in this study belongs to this affected area, where the mean incidence rate reached 44.55 cases

per 100,000 inhabitants in 2013 (data provided by Autonomous Community of Madrid). In case of Mediterranean area, other studied region, Minorca (Balearic Islands), were reported an emergence of canine leishmaniasis (Gil-Prieto et al., 2011; Alcover et al., 2013; Arce et al., 2013; Ballart et al., 2013).

The knowledge of possible reservoirs implicated in an area affected with leishmaniasis is essential when deciding which control measures are needed to take. In this sense, the study of blood meal sources of vectors plays an essential role. Accordingly, serological techniques as ELISA were applied as first approach in this way (De Colmenares et al., 1995; Bongiorno et al., 2003), although these methods have been replaced by molecular tools for their better accuracy (Mukabana et al., 2002; Haouas et al., 2007; Kent 2009; Maleki-Ravasan et al., 2009). Amplification by polymerase chain reaction (PCR) and subsequent sequencing is widely used to study blood meal preferences in sand flies and other vectors as mosquitoes or ticks (Kirstein and Gray 1996; Oshagi et al., 2006; Danabalan et al., 2014). Thus, different molecular targets like cytochrome *b* (*cyt b*), cytochrome oxidase I (COI) and prepronociceptin (PNOC) are being used to detect the origin of blood meals

* Corresponding author. Fax: +34 91 509 7034.

E-mail address: mjimenez@isciii.es (M. Jiménez).

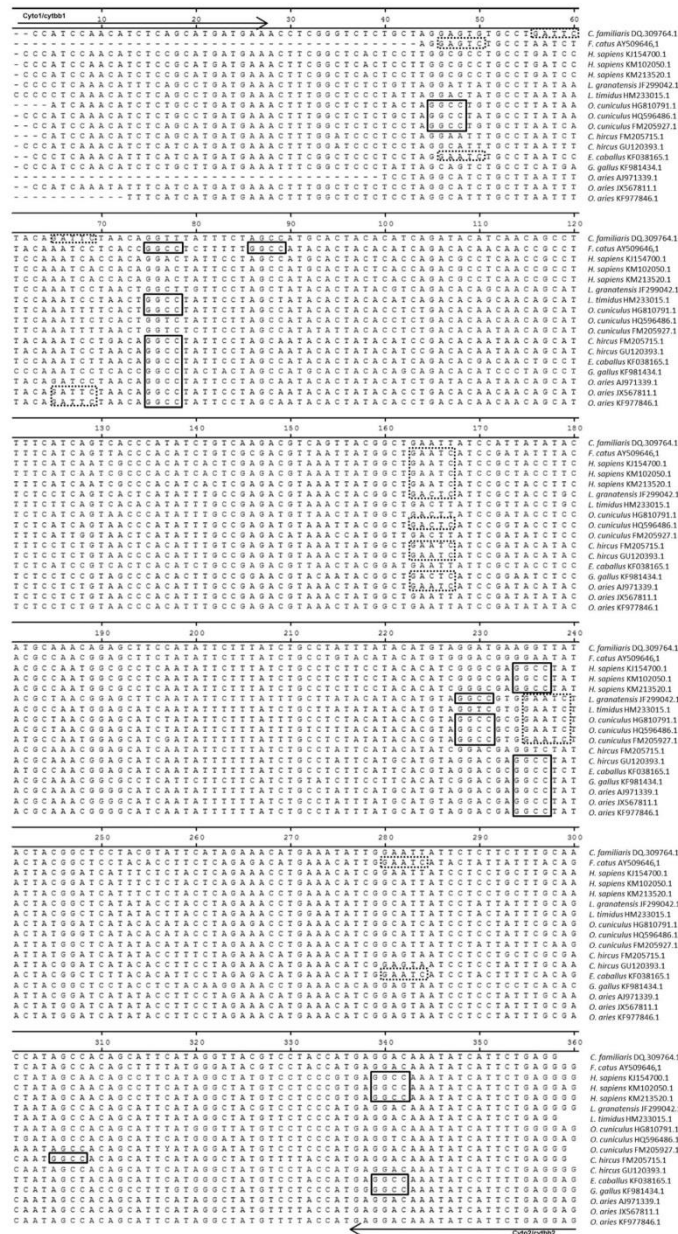


Fig. 1. Alignment of 359 bp *cyt b* fragment of the different species of vertebrates, remarking restriction sites of *HaeIII* ('GGCC') (continuous line) and *HinfI* ('GANTC') (broken line). The following sequences were used: *C. familiaris* (DQ309764.1); *F. catus* (AY50646.1); *H. sapiens* (KJ154700.1, KM12050.1, KM213520.1); *L. griseus* (JF299042.1) and *L. timidus* (HM233015.1); *O. cuniculus* (HG810791.1, HQ596486.1, FM205927.1); *C. hircus* (FM205715.1, GU120393.1) *E. caballus* (KF038165.1); *G. gallus* (KF981434.1) and *O. aries* (AJ971339.1, JX567811.1, KF977846.1).

Table 1Sand fly description and corresponding blood meal identification by PCR-sequencing and *cyt b*-RFLP.

Sand fly identification	Sand fly origin/year	PCR <i>cyt b</i> -sequencing	Genbank™ homologous sequence (% Similarity)	<i>cyt b</i> -RFLP	
				HaeIII (bp)	HinfI (bp)
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2014	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	HG810791.1 ^{b,c} (97%)	30, 45, 131, 153	125, 234
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2014	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	HG810791.1 ^{b,c} (98%)	30, 45, 131, 153	125, 234
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2014	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	HG810791.1 ^{b,c} (99%)	30, 45, 131, 153	125, 234
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2013	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	HG810791.1 ^b (99%)	30, 45, 131, 153	125, 234
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2013	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	HG810791.1 ^b (99%)	30, 45, 131, 153	125, 234
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2013	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	HG810791.1 ^{b,c} (99%)	30, 45, 131, 153	125, 234
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2013	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	HG810791.1 ^{b,c} (99%)	30, 45, 131, 153	125, 234
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2013	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	HQ596486.1 ^d (92%)	45, 131, 183	72, 125, 162
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2013	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	FM205927.1 (96%)	45, 131, 183	125, 234
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2014	<i>Lepus granatensis</i>	JF299042.1 ^b (98%)	131, 228	72, 125, 162
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2014	<i>Lepus granatensis</i>	JF299042.1 ^b (98%)	131, 228	72, 125, 162
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2013	<i>Lepus granatensis</i>	JF299042.1 ^b (99%)	131, 228	72, 125, 162
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2013	<i>Lepus timidus</i>	HM233015.1 (99%)	75, 284	125, 234
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2014	<i>Homo sapiens</i>	KM102050.1 (99%)	20, 105, 234	162, 197
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2013	<i>Homo sapiens</i>	KM213520.1 (99%)	20, 105, 234	162, 197
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2013	<i>Felis catus</i>	AY509646.1 (99%)	11, 20, 74, 254	45, 79, 117, 117
<i>P. perniciosus</i>	Madrid/2012	<i>Canis familiaris</i>	DQ309764.1 (89%)	359	9, 55, 295
<i>P. perniciosus</i>	Girona/2012	<i>Equus caballus</i>	KF038165.1 (99%)	20, 75, 105, 159	45, 80, 234
<i>P. ariasi</i>	Girona/2012	<i>Ovis aries</i>	JX567811.1 (99%)	75, 125, 159	64, 295
<i>P. ariasi</i>	Girona/2012	<i>Ovis aries</i>	KF977846.1 (99%)	75, 125, 159	64, 295
<i>P. ariasi</i>	Girona/2012	<i>Ovis aries/Capra hircus</i>	AJ971339.1 (96%)/GU120393.1 ^c (96%)	75, 125, 159	64, 295 /163, 196
NI ^a	Girona/2012	<i>Ovis aries/Capra hircus</i>	AJ971339.1 (96%)/GU120393.1 ^c (96%)	75, 125, 159	64, 295 /163, 196
NI ^a	Girona/2012	<i>Ovis aries/Capra hircus</i>	AJ971339.1 (96%)/GU120393.1 ^c (96%)	75, 125, 159	64, 295 /163, 196
<i>P. perniciosus</i>	Girona/2012	<i>Ovis aries/Homo sapiens</i>	KF977846.1 (99%)/KJ154700.1 (97%)	75, 125, 159 / 20, 105, 234	64, 295 /163, 196
<i>P. perniciosus</i>	Minorca/2013	<i>Capra hircus</i>	FM205715.1 ^c (99%)	54, 75, 230	163, 196
<i>P. perniciosus</i>	Minorca/2013	<i>Gallus gallus</i>	KF981434.1 (99%)	20, 75, 105, 159	10, 162, 187

^a NI, not identified (no genitalia).^b Sequences with nucleotide polymorphisms that do not affect to restriction sites.^c Sequences with nucleotide polymorphisms that result in different band pattern with restriction enzyme HaeIII.^d Sequence with nucleotide polymorphism that result in different band pattern with restriction enzyme HinfI.

(Kocher et al., 1989; Haoaus et al., 2007; Abassi et al., 2009). On the other hand, other techniques as PCR- restriction fragment length polymorphism (RFLP) or PCR- reverse-line blotting (RLB) have been developed in order to study blood meal preferences in mosquitoes, tsetse flies and sand flies (Osaghi et al., 2006; Steuber et al., 2005; Maleki-Ravasan et al., 2009; Quaresma et al., 2012; Soares et al., 2014; Gebresilassie et al., 2015).

In previous studies, PCR of a 359 bp fragment of the conserved gene *cyt b* and further sequencing were applied in the study of blood meal sources in sand flies collected in the area of a leishmaniasis outbreak occurring in southwest Madrid region, Spain. This method provided significant information about the role that hares and rabbits are playing as reservoirs, in the focus (Jiménez et al., 2013, 2014).

The aim of this work was to develop a PCR-RFLP method targeting the fragment of 359 bp of vertebrate *cyt b* gene. The protocol was validated in twenty six blood fed female sand flies collected in the field with CDC traps in three separate entomological surveys carried out during 2012–2014 in three different regions of Spain. Blood meal preferences in all sand flies were studied at first by PCR of the 359 bp fragment of *cyt b* following sequencing.

The developed *cyt b* PCR-RFLP proved to be an effective and reliable approach in the identification of blood meals in sand flies, alternative to the PCR and sequencing method, to be used in entomological surveys.

2. Material and methods

2.1. Sand flies and DNA extraction

Female sand flies used in this study were collected with CDC traps in three separate entomological surveys carried out in the transmission period of 2012–2014 in three different regions from Spain: Fuenlabrada (southwest Madrid, center of Spain, $n = 17$),

Girona (northeast Catalonia, northeast of Spain, $n = 7$) and Minorca (Balearic Islands, $n = 2$) (Table 1). In all cases sand flies were stored in ethanol 70° at 4 °C until processed.

Sand flies were washed individually in sterile distilled water using ELISA plates to eliminate ethanol. After that, wings and legs were removed, and head and genitalia were cleared and mounted in Hoyer medium for later morphological identification under the microscope.

DNA of sand flies was obtained from thorax and abdomen using the DNeasy® Blood & Tissue Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Quantification and purity of the DNA was determined by spectrophotometry with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). In all cases DNA samples were stored at –20 °C until use.

2.2. PCR-*cyt b* and sequence analysis

Blood meal identification in sand flies was conducted by the amplification of a fragment of 359 bp of vertebrate *cyt b* gene followed by sequencing as described before (Jiménez et al., 2013, 2014). Multiple sequence alignment was obtained by Clustal W method in Megalign program (DNASTAR, Lasergene v7.1®, Madison, WI) with homologous sequences of the 359 bp *cyt b* gene fragment of different species of vertebrates found in sand flies blood meals obtained using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) and retrieved from Genbank™. The following sequences were used: *Canis familiaris* (DQ309764.1); *Felis catus* (AY509646.1); *Homo sapiens* (KJ154500.1, KM102050.1, KM213520.1); *Lepus granatensis* (JF299042.1) and *L. timidus* (HM233015.1); *Oryctolagus cuniculus* (HG810791.1, HQ596486.1, FM205927.1); *Capra hircus* (FM205715.1, GU120393.1) *Equus caballus* (KF038165.1); *Gallus gallus* (KF981434.1) and *Ovis aries* (AJ971339.1, JX567811.1, KF977846.1). The predicted endonuclease restriction sites HaeIII

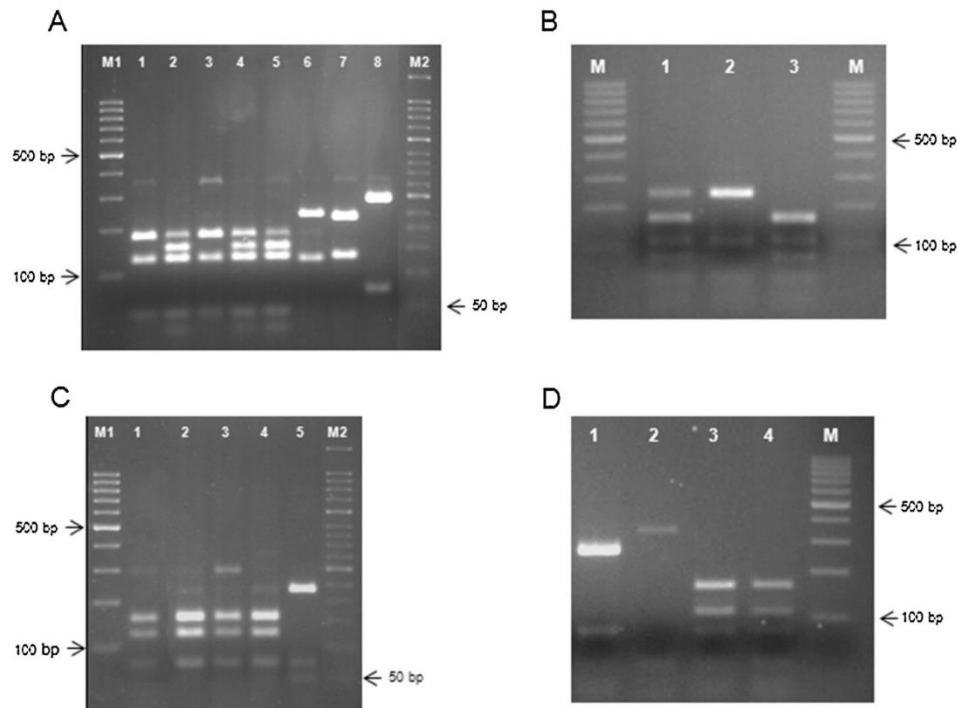


Fig. 2. *Cyt b* PCR products digested with restriction enzyme *HaeIII*.

A: Lane M1, 100 bp molecular weight marker (Biotools), lane 1 *O. cuniculus* (HQ596486.1; 45, 131, 183 bp), lanes 2, 4 and 5 *O. cuniculus* (HG810791.1; 30, 45, 131, 153 bp), lane 3 *O. cuniculus* (FM205927.1; 45, 131, 183 bp), lane 6 *H. sapiens* (20, 105, 234 bp), lane 7 *L. granatensis* (131, 228 bp), lane 8 *L. timidus* (75, 284 bp), lane M2 50 bp molecular weight marker (Takara). B: Lane M 100 bp molecular weight marker (Biotools), lane 1 *O. aries/H. sapiens*, lane 2 *H. sapiens*, lane 2 *O. aries*. C: Lane M1, 100 bp molecular weight marker (Biotools), lane 1–3 mixed blood meal *O. aries/C. hircus*, lane 4 *C. hircus* (54, 75, 230), lane 5 *O. aries* (75, 125, 159 bp), lane M2 50 bp molecular weight marker (Takara). D: Lane 1 *F. catus* (11, 20, 74, 254 bp), lane 2 *C. familiaris* (359 bp), lanes 3 *E. caballus* (20, 75, 105, 159 bp), lane 4 *G. gallus* (20, 75, 105, 159 bp), lane M 100 bp molecular weight marker (Biotools).

and *HinfI* were analyzed with the bioinformatics program SeqBuilder (DNASTAR, Lasergen v7.1[®], Madison, WI) (Fig. 1).

2.3. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of *cyt b* (PCR-RFLP *cyt b*)

Amplification of a fragment of 359 bp of *cyt b* gene was performed as defined before with few modifications (Jiménez et al., 2013, 2014). Degenerated primers: *cyt.bb1* (5'-CCA TCM AAC ATY TCA DCA TGA TGA AA-3') and *cyt.bb2* (5'-GCH CCT CAG AAT GAY ATT TGG CCT CA-3) were used (Svobodova et al., 2009). PCR was carried out with 70 ng of DNA in a final volume of 25 µl: 1× Buffer (Roche[®], Basel, Switzerland), 1.5 mM MgCl₂ (Roche[®], Basel, Switzerland), 100 µM dNTPs mixture (10 mM, Roche[®], Basel, Switzerland), AmpliTaqGold (Roche[®], Basel, Switzerland), 1 µl of BSA DNase Free (20 mg/ml, Roche[®], Basel, Switzerland). Primers were used in a concentration of 0.5 µM. PCR amplification was performed as follows: one cycle of 9 min at 95 °C, followed by 40 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s and elongation at 72 °C for 45 s; final elongation was at 72 °C for 10 min (Thermocycle GeneAmp[®] PCR system 2700, Applied Biosystems, Foster, CA). Subsequently, 25 µL of each PCR product was digested with 3U of *HaeIII* and 5U of *HinfI* at 37 °C overnight in

30 µl of reaction volume according to the manufacturer's protocols (New England Biolabs, UK). The digested PCR products were then fractionated in 3% MS-8 agarose (Conda[®], Spain) gel stained with Pronasafe Nucleic Acid Staining Solution (10 mg/ml) (Conda[®], Spain) and specific band patterns were observed under UV light exposure.

3. Results and discussion

A total of twenty-six blood fed sand flies captured in three different entomological surveys performed in different locations during the transmission period of 2012–2014 were selected for this study. Of these, seventeen fed female sand flies were captured in the active human leishmaniasis focus of Fuenlabrada (Madrid). Moreover, seven sand flies from Girona (Catalonia) and two from Minorca (Balearic Islands) were analyzed (Table 1).

Firstly, the analysis of blood preferences was carried out by the amplification of a fragment of 359 bp of vertebrate *cyt b* gene, further sequencing, and subsequent comparison with homologous sequences deposited in the GenBank[™] using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Regarding to the sand flies from Madrid, all were identified as *P. perniciosus*. Analysis of blood feeding preferences revealed that sand flies mainly fed on rabbit ($n=9$). Other sources

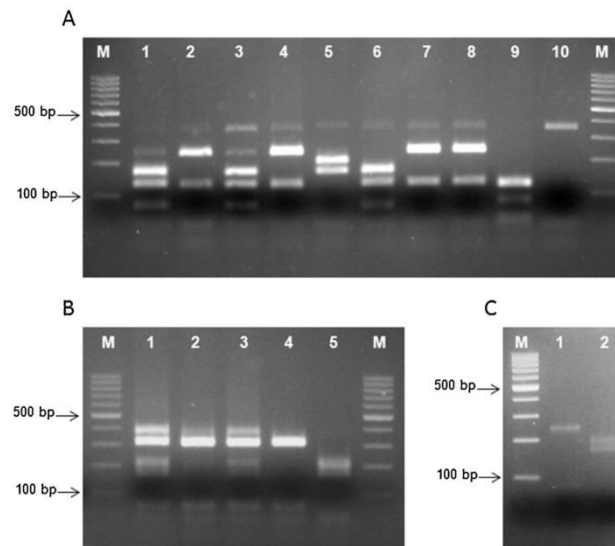


Fig. 3. *Cyt b* PCR products digested with restriction enzyme *HinfI*.

A: Lane M 100 bp molecular weight marker (Biotools), lane 1 *O. cuniculus* (HQ596486.1; 72, 125, 162 bp), lanes 2, 4 and 7 *O. cuniculus* (HG810791.1; 124, 235 bp), lane 3 *O. cuniculus* (FM205927.1; 124, 235 bp), lane 5 *H. sapiens* (162, 197 bp), lane 6 *L. granatensis* (72, 135, 162 bp), lane 8 *L. timidus* (124, 235 bp), lane 9 *F. catus* (45, 79, 117, 117 bp), lane 10 *C. familiaris* (9, 55, 295 bp). B: Lane M 100 bp molecular weight marker (Biotools), lane 1–3 mixed blood meal *O. aries/C. hircus*, lane 4 *O. aries* (64, 295 bp), lane 5 *C. hircus* (163, 196 bp). C: Lane M 100 bp molecular weight marker (Biotools), lane 1 *E. caballus* (45, 80, 234 bp), lane 2 *G. gallus* (10, 162, 187 bp).

of vertebrates found were hare ($n=4$), human ($n=2$), cat ($n=1$) and dog ($n=1$) (Table 1).

Moreover, sand flies from Girona were identified as *P. perniciosus* ($n=2$) and *P. ariasi* ($n=3$). From these, one *P. perniciosus* was fed on horse and two *P. ariasi* on sheep. Additionally, two mixed blood meals – sheep/human and sheep/goat – were detected in both *P. perniciosus* ($n=1$) and *P. ariasi* ($n=1$), respectively. In the remaining two sand flies from Girona (species not identified, there were no genitalia) mixed blood meals – sheep/goat – were detected. The two *P. perniciosus* from Minorca were fed on chicken and goat, respectively (Table 1).

Analysis of multiple sequence alignment by CLUSTAL W method of homologous sequences of 359 bp of *cyt b* was carried out searching for specific restriction sites in each sequence for a RFLP approach. Restriction endonucleases *HaeIII* and *HinfI* were able to distinguish a differential pattern of fragments in the targeted species according with the results obtained by the bioinformatic program Seqbuilder (Fig. 1). With the aim to confirm these bioinformatic analysis, PCR products of 359 bp *cyt b* gene obtained from fed sand flies previously described were digested with restriction endonucleases *HaeIII* and *HinfI*.

The RFLP band pattern produced by these two restriction enzymes used in combination is able to discriminate among the 359 bp *cyt b* fragments of all the vertebrates analyzed (Figs. 2 and 3). In addition, the band pattern obtained using *HaeIII* and *HinfI* shows differences in the 359 bp *cyt b* fragment even among closely related species of hares as *L. granatensis* and *L. timidus*, which appear in Spain as an introgression of the *cyt b* gene (Alves et al., 2003; Melo-Ferreira et al., 2012) (Figs 2A and 3A). In this way, hares have been demonstrated to be an important reservoir in the active focus of leishmaniasis in southwest of Madrid. In this sense, this PCR-RFLP *cyt b* method allows to differentiate this reservoir from the others found in the focus (Molina et al., 2012; Jiménez et al., 2013).

Moreover, digestion with restriction enzyme *HaeIII* was not able to discriminate among two vertebrate sequences (Fig. 2D), this is the case of *E. caballus* (KF038165.1, lane 3) and *G. gallus* (KF981434.1, lane 4) giving rise to 20, 75, 105 and 159 bp band pattern. On the other hand, *HinfI* enzyme solves this match by providing a different band pattern enable to distinguish these species (Fig. 3C). Otherwise, *HinfI* could not differentiate between sequences (Fig. 3A) as *L. granatensis* (JF299042.1, lane 6) and *O. cuniculus* (HQ596486.1, lane 1) appear with an identical band pattern of 25, 125 and 162 bp; or between *L. timidus* (HM233015.1, lane 8) and *O. cuniculus* (HG810791.1, lanes 2, 4, 7; FM205927.1, lane 3), which match in a band pattern of 125 and 234 bp (Table 1 and Fig. 3A). In these cases, *HaeIII* is able to distinguish these species (Fig. 2A). Consequently, it is necessary to use the two restriction enzymes in order to obtain conclusive results.

Unexpected bands appear in the gel visualization in some specimens. Partial digestion or contamination seems unlikely; consequently the most probable explanation of these bands could be the co-amplification of *cyt b* pseudogenes, as reported before (Meyer et al., 1995; Partis et al., 2000).

Moreover, when analyzing blood meals of female sand flies from Fuenlabrada fed on rabbits and hares, we found some nucleotide polymorphism between sequences of the same species. Some of these differences do not affect the restriction sites and in BLAST analysis homologous sequences JF299042.1 and HG810791.1 matching *cyt b* sequences corresponding to *L. granatensis* and *O. cuniculus* present the maximum similarity situated between 97 and 99% (^b labelled in Table 1). On the other hand, some nucleotide differences affect the restriction sites like in rabbit and goat sequences. Thus, 359 bp *cyt b* sequences that match with Genbank™ homologous sequences *O. cuniculus* (HG810791.1) and *C. hircus* (GU120393.1) present one more restriction site with *HaeIII*, located at position nt=76 and nt=235, respectively (^c labelled

in Table 1, Fig. 1). In the case of restriction enzyme *HinfI*, the homologous sequence in GenbankTM HQ596486.1 shows one more restriction site at position nt=165, which is not present in the other sequences of rabbits (^d labelled in Table 1, Fig. 1). In case of homologous GenbankTM sequence DQ309764.1, corresponding to *C. familiaris*, *HinfI* cuts in two sites according to bioinformatics study, however gel visualization did not show any band pattern (Figs. 2D and 3A). These differences are visible in the band fragment pattern and might possibly be due to polymorphism within the species. This intra-specific variation in *cyt b* gene has been previously reported (Meyer et al., 1995; Branco et al., 2000).

Study of mixed blood meals by sequencing can be difficult in some cases due to the apparition of background peaks that complicate the identification of possible mixed blood meals. Similarly, although the ELISA and PCR-RLB techniques may allow identifying mixed blood meals by testing different antigens and probes, respectively (De Colmenares et al., 1995; Rossi et al., 2008; Abassi et al., 2009) both methods are more complex than PCR-RFLP. Moreover, in ELISA based methods frequently cross-reactions were observed between close species (De Colmenares et al., 1995). On the other hand, in PCR-RLB the design and application of species-specific probes for a large number of different hosts is difficult to optimize and several problems with cross-hybridization occur (Abassi et al., 2009).

As an alternative, PCR-RFLP methodology shows a simple analyzable band pattern. In this study, mixed blood meals from four sand flies were distinguished by *cyt b*-RFLP protocol, all of them from Girona (Table 1). Both restriction enzymes, *HaeIII* and *HinfI*, generate a differential pattern that allows distinguishing the mixed blood meal from human and sheep, (75, 125, 159/20, 105, 234 bp) and (64, 295/162, 197 bp), respectively found in *P. perniciosus* (Figs. 2B and 3A, B). In case of goat/sheep mixed blood meals found in one *P. ariasi* and two unclassified sand flies, the restriction enzyme study at first indicated that only *HinfI* was able to discriminate between the two species (Fig. 1 and Table 1), although band pattern visualization after digestion with both enzymes showed that the two restriction enzymes could differentiate this mixed blood meal (Figs. 2C and 3B). This discrepancy among the bioinformatic study and band pattern visualization may possibly be caused by polymorphism in the nucleotide sequence, as explained before.

Accordingly, the *cyt b*-RFLP presented here supports the results previously obtained by PCR following by sequencing of the 359 bp fragment of *cyt b* (Jiménez et al., 2013; Jiménez et al., 2014). Moreover, this method is less time consuming and could be an alternative to sequencing.

In conclusion, this PCR-RFLP *cyt b* method shows to be highly effective for the analysis of blood meal preferences and the differentiation of mixed blood meals in phlebotomine sand flies, caught in Spain. Although, this method should be evaluated and validated by investigators in the specific regions of study in order to apply it in the identification of sand fly blood meal preferences.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was partially sponsored and funded by: Dirección General de Ordenación e Inspección, Consejería de Sanidad (CM), Colegio de Veterinarios de Madrid, Colegio de Biólogos de Madrid, Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (CG12010-22368-CO2-01), Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, Spain (2009SGR385) and EU grant FP7-2011-261504 and is cataloged by the Steering Committee as

EDENext370 (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

References

- Abassi, I., Cunio, R., Warburg, A., 2009. Identification of bloodmeals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome *b* PCR and reverse line blotting. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 9, 79–86.
- Alcover, M.M., Ballart, C., Serra, T., Castells, X., Scalone, A., Castillejo, S., Riera, C., Tebar, S., Gramiccia, M., Portús, M., Gállego, M., 2013. Temporal trends in canine leishmaniasis in the Balearic Islands (Spain): a veterinary questionnaire. Prospective canine leishmaniasis survey and entomological studies conducted on the Island of Minorca, 20 years after first data were obtained. *Acta Trop.* 128, 642–651.
- Alves, P.C., Ferrand, N., Suchentrunk, F., Harris, D.J., 2003. Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27, 70–80.
- Arce, A., Estirado, A., Ordoñez, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martínez, A.M., Pérez, A.M., Aránguez, E., Iriaso, A., Sevillano, O., Bernal, J., Vilas, F., 2013. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 25, 20546.
- Ballart, C., Alcover, M.M., Picado, S., Nieto, J., Castillejo, S., Portús, M., Gállego, M., 2013. First survey on canine leishmaniasis in a non classical area of the disease in Spain (Lleida, Catalonia) based on a veterinary questionnaire and a cross-sectional study. *Prev. Vet. Med.* 1, 116–127.
- Bongiorno, G., Habluetzel, A., Khoury, C., Maroli, M., 2003. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop.* 88, 106–119.
- Branco, M., Ferrand, N., Monnerot, M., 2000. Phylogeography of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in the Iberian Peninsula inferred from RFLP analysis of the cytochrome *b* gene. *Heredity* 82, 307–317.
- Danabalan, R., Monaghan, M.T., Ponsonby, D.J., Linton, Y.M., 2014. Occurrence and host preferences of *Anopheles maculipennis* group mosquitoes in England and Wales. *Med. Vet. Entomol.* 28, 169–178.
- De Colmenares, M., Portús, M., Botet, J., Dobaño, C., Gállego, M., Wolff, M., Seguí, G., 1995. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *J. Med. Entomol.* 32, 229–233.
- Del Río, L., Chitimia, L., Cubas, A., Victoriano, I., De la Rúa, P., Gerrikagoitia, X., Barral, M., Muñoz-García, C.I., Goyena, E., García-Martínez, D., Fisa, R., Riera, C., Murcia, L., Segovia, M., Berriatua, E., 2013. Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. *Prev. Vet. Med.* 113, 430–435.
- Gebresilassie, A., Abbasi, I., Akilu, E., Yared, S., Kirstein, O.D., Moncaz, A., Tekie, H., Balkew, M., Warburg, A., Hailu, A., Gebre-Michael, T., 2015. Host-feeding preference of *Phlebotomus orientalis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in northern Ethiopia. *Parasit. Vector* 8, 270.
- Gil-Prieto, R., Walter, S., Alvar, J., Gil de Miguel, A., 2011. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997–2008). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85, 820–825.
- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, R., Dedet, J., Badda, H., Ravel, C., 2007. Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir by bloodmeal analysis in the insect vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 1054–1059.
- Jiménez, M., González, E., Iriaso, A., Marco, E., Alegret, A., Fuster, F., Molina, R., 2013. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol. Res.* 112, 2453–2459.
- Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., Molina, R., 2014. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet. Parasitol.* 202, 296–300.
- Kent, R.J., 2009. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 4–18.
- Kirstein, F., Gray, J.S., 1996. A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 4060–4065.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 6196–6200.
- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M.A., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J., Mohtarami, F., 2009. Blood meal identification in field-captured sand flies: comparison of PCR-RFLP and ELISA assays. *Iran. J. Arthropod-Borne Dis.* 3, 8–18.
- Melo-Ferreira, J., Boursot, P., Carneiro, M., Esteves, P.J., Farelo, L., Alves, P.C., 2012. Recurrent introgression of mitochondrial DNA among hares (*Lepus* spp.) revealed by species-tree inference and coalescent simulations. *Syst. Biol.* 61, 1–15.
- Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J., Candrian, U., 1995. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J. AOAC Int.* 78, 1542–1551.

- Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol.* 190, 268–271.
- Mukabana, W.R., Takken, W., Knols, B.G.J., 2002. Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. *Trends Parasitol.* 18.
- Oshagi, A., Chasshin, A.R., Vatandoost, H., 2006. Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers. *Exp. Parasitol.* 114, 259–264.
- Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T., Murby, J., 2000. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci.* 54, 369–376.
- Quaresma, P.F., de Lima Carvalho, G.M., das Neves Farah Ramos, M.C., Andrade Filho, J.D., 2012. Natural *Leishmania* spp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 480–485.
- Rioux, J.A., Guilvard, E., Gállego, J., Moreno, G., Pratlong, F., Portús, M., Rispail, P., Gállego, M., Bastien, P., 1986. Intervention simultanée de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *P. perniciosus* Newstead 1911 dans un même foyer. Infestations par deux zymodèmes syntopiques. A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne). En: *Leishmania: Taxonomie et Phylogénèse* I.M.E.E.E., Montpellier, 439–444.
- Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 2008. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop.* 105, 158–165.
- Ruiz-Fons, F., Ferroglio, E., Cortázar, C., 2013. *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004–2010. *Euro Surveill.* 18, 20541.
- Soares, V.Y., Silva, J.C., Silva, K.R., Pires e Cruz Mdo, S., Santos, M.P., Ribolla, P.E., Alonso, D.P., Coelho, L.F., Costa, D.L., Costa, C.H., 2014. Identification of blood meal sources of *Lutzomyia longipalpis* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the cytochrome B gene. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 379–383.
- Steuber, S., Abdel-Rady, A., Clausen, P.H., 2005. PCR-RFLP analysis: a promising technique for 401 host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: 402 Glossinidae). *Parasitol. Res.* 97, 247–254.
- Svobodova, M., Alten, B., Zidkova I. Dvorak, V., Hlavackova, J., Myšková, V., Seblava, V., Kasap, O.E., Belen, A., Votypka, J., Volf, P., 2009. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *Int. J. Parasitol.* 39, 251–256.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Natural transmission of *Leishmania infantum* through experimentally infected *Phlebotomus perniciosus* highlights the virulence of *Leishmania* parasites circulating in the human visceral leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain

Inés Martín-Martín¹, Maribel Jiménez^{1*}, Estela González¹, César Eguiluz^{2^} and Ricardo Molina^{1*}

Abstract

A human leishmaniasis outbreak is occurring in the Madrid region, Spain, with the parasite and vector involved being *Leishmania infantum* and *Phlebotomus perniciosus* respectively. The aim of this study was to investigate the virulence of *L. infantum* isolates from the focus using a natural transmission model. Hamsters were infected by intraperitoneal inoculation (IP) or by bites of sand flies experimentally infected with *L. infantum* isolates obtained from *P. perniciosus* collected in the outbreak area (IPER/ES/2012/BOS1FL1 and IPER/ES/2012/POL2FL6) and a well characterized *L. infantum* strain JPCM5 (MCAN/ES/98/LLM-877). Hamster infections were monitored by clinical examination, serology, culture, parasite burden, Giemsa-stained imprints, PCR, histopathology and xenodiagnostic studies. Establishment of infection of *L. infantum* was achieved with the JPCM5 strain and outbreak isolates by both *P. perniciosus* infective bites or IP route. However, high virulence of BOS1FL1 and POL2FL6 isolates was highlighted by the clinical outcome of disease, high parasite detection in spleen and liver, high parasitic loads and positivity of *Leishmania* serology. Transmission by bite of POL2FL6 infected flies generated a slower progression of clinical disease than IP infection, but both groups were infective to *P. perniciosus* by xenodiagnosis at 2 months post-infection. Conversely, hamsters inoculated with JPCM5 were not infective to sand flies. Histopathology studies confirmed the wide spread of POL2FL6 parasites to several organs. A visceral leishmaniasis model that mimics the natural transmission in nature allowed us to highlight the high virulence of isolates that are circulating in the focus. These findings contribute to a better understanding of the outbreak epidemiology.

Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is considered one of the most devastating neglected diseases accounting worldwide with 58 000 cases per year [1]. The causative agent in the Mediterranean Basin is *Leishmania infantum* being promastigote forms transmitted to the vertebrate host by the

bite of infected sand flies [2]. Animal models are essential to test new treatments and vaccines to fight this disease. In cutaneous leishmaniasis (CL), rodents have been widely used to reproduce skin lesions [3]. However, in the case of VL, mice do not completely reflect the human development of the disease and even infection in susceptible mice strains to *L. infantum* may become chronic. Therefore, the hamster is considered a better model to reproduce the clinicopathological features of human VL [3] and has been widely used for immunological studies [4–7]. A proper and reliable animal model should mimic the natural transmission conditions with special emphasis on dose, pathogen stage delivered, co-administered

*Correspondence: mjimenez@isciii.es; rmolina@isciii.es

²Deceased

¹Unidad de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Martín-Martín et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

molecules and administration route [8]. In the case of *Leishmania*, transmission occurs when an infected sand fly takes or attempts to take a blood meal from the vertebrate host. This is a complex process in which sand flies, as telmophagic insects, need to lacerate tissues and create a hemorrhagic pool from where they ingest blood.

Arthropod-borne pathogens have adapted their routes of entry into the vertebrate hosts. The administration route determines the first encounter of the parasite with the immune system, which can drive either to a susceptible or protective response and is highly involved in the outcome of cutaneous or visceral disease. Therefore, infections initiated by parasites directly delivered into the bloodstream do not reproduce the immunological responses that take place under natural conditions [8].

The required number of parasites to initiate a *Leishmania* infection seems to depend on the *Leishmania* species or even the strain. Natural infectious doses are much lower than the experimental infectious doses used for parasite infection in the laboratory where 10^8 or 10^7 promastigotes are usually inoculated. The average of *L. infantum* parasites ejected from *Lutzomyia longipalpis* was recently established at 1000 promastigotes by Rogers et al., who analyzed it with feeding infected sand flies through chick skin [9]. Natural transmission models have provided information regarding individual variability. Concretely, the number of inoculated parasites in the *Leishmania major*-*Phlebotomus duboscqi* combination follow a bimodal distribution, corresponding to a low dose of less than 600 parasites, and a high dose between 1000 and 100 000 parasites [10]. Other authors have offered similar results and demonstrated that sand flies infected with a dermatropic strain inoculate a greater number of parasites than sand flies infected with a viscerotropic strain [11]. Moreover, *Leishmania* ejected doses do not seem to depend on the nature of the vertebrate hosts [12].

Leishmania parasites are inoculated into the dermis of the host along with very active immunomodulatory substances such as saliva and promastigote secretory gel (PSG). Sand fly saliva counteracts vertebrate hemostatic and immune responses to ensure blood feeding success and has been directly involved in the establishment of infection [13, 14]. On the contrary, PSG blocks the anterior part of the midgut and stomodeal valve. As a consequence, metacyclic promastigotes are regurgitated during blood feeding, resulting in an improved transmission efficacy [15].

In leishmaniasis animal models, cultured promastigotes are normally used as the source of infective material which is not the appropriate pathogen stage delivered in nature. Among several promastigote forms present in the midgut of sand flies only metacyclic stages are known to

be resistant to vertebrate complement destruction and therefore able to initiate infection [16]. This drawback is usually overcome by working with stationary phase cultures which are enriched in metacyclic forms or isolation of metacyclic promastigotes by lectin agglutination [17].

Reports of laboratory transmission of *Leishmania* spp. by experimentally infected sand flies are still scarce. Success of natural transmission has been achieved mainly in CL models [14, 18–25]. Although VL models initiated through infected sand fly bites are not easy to reproduce, several studies have been conducted using mice, hamsters, rats or dogs as vertebrate hosts demonstrating successful transmission [11, 12] or both successful transmission and animal infection follow-up [26–33].

Human leishmaniasis due to *L. infantum* is endemic in Spain. However, there has been an unusual rise of human leishmaniasis cases in an urban area of the south-western Madrid region since 2010 [34]. A total of 616 human cases have been reported from the beginning of the outbreak to February 2015, corresponding to 38% VL. The large number of human cases has led to an increased incidence from 2.44/100 000 inhabitants in 2009 to 49.0/100 000 inhabitants in 2014 in Fuenlabrada, the most affected municipality (Community of Madrid, personal communication). On the contrary, canine leishmaniasis prevalence in the focus is lower than the average in the Madrid region [35, 36] and two wild animals—the hare and the rabbit—have shown to play a role as reservoirs [37, 38].

In this work, our aim was to study the virulence of *L. infantum* isolates that are circulating in the human leishmaniasis outbreak of Madrid using a natural transmission model of VL in the hamster.

Materials and methods

Parasites

Leishmania infantum parasites used in this study included two isolates from *Phlebotomus perniciosus* collected in the field during the entomological survey carried out in the transmission season of 2012 in the human leishmaniasis outbreak area in Madrid (IPER/ES/2012/BOS1FL1 and IPER/ES/2012/POL2FL6, referred to as BOS1FL1 and POL2FL6, respectively). Simultaneously, the well characterized *L. infantum* strain JPCM5 was used as a control. JPCM5 is a clone obtained from the JPC strain isolated from a naturally infected dog (MCAN/ES/98/LLM-877) and maintained at the WHO Collaborating Center for Leishmaniasis, Parasitology Department, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain. This clone was used for *L. infantum* genome sequencing [39] and has been widely utilized for experimental challenge [40].

All parasites were passaged through hamsters before the experiments. Promastigotes were cultured at 27 °C in

NNN and RPMI supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (FCS, Lonza, Basilea) and a mixture of penicillin and streptomycin (10 000 U/mL, Lonza, Basilea).

Experimental infection of sand flies

A *Phlebotomus perniciosus* colony originally established with specimens collected in an endemic area of leishmaniasis in Madrid, Spain [41] maintained at 27 °C and 17:7 light-darkness photo-period at the insectary of the Medical Entomology Unit of the ISCIII was used. Three to six-day old female sand flies were fed on a mixture of defibrinated rabbit blood and 2.5×10^8 or 2.5×10^7 /mL cultured promastigotes of JPCM5 strain or POL2FL6 isolate through a feeding device of chick skin membrane. Blood-fed female sand flies were separated and kept in a cage and after 5 days flies were transferred to oviposition pots. Some sand flies were dissected in order to evaluate the midgut infection development. Five days later which corresponded to 10 days after experimental infection, sand flies were allowed to take a second blood meal on hamsters to initiate parasite transmission. A total of four experimental infections of *P. perniciosus* with *L. infantum* promastigotes were conducted including two experimental infections with JPCM5 strain and two other with the POL2FL6 isolate.

Animal infections

Six-week-old goldhamsters (*Mesocricetus auratus*, strain RjHan:AURA, Janvier, France) were housed at the animal facilities of the ISCIII. Animal handling was carried

out according to the standards specified in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals and approved by the ethics committees for animal care and experimentation of the ISCIII (CBBA/4.2-PA 225/08). A total of 30 hamsters were divided into eight groups. They include four subgroups that were infected by natural transmission either with JPCM5 or POL2FL6 parasites, two subgroups of hamsters that were intraperitoneally inoculated with 10^7 cultured promastigotes of JPCM5 strain and POL2FL6 isolate and a control group (uninfected). Additionally, two hamsters (Group H8) were inoculated with 10^7 cultured promastigotes of BOS1FL1 isolate (Figure 1). For sand fly transmission, animals were anaesthetized with 150 mg/kg ketamine by subcutaneous route and individually placed in cages containing an average of 36 (SD = 18) potentially infected sand flies, depending on the survival rate after oviposition for each sand fly infection set (Table 1). During the exposure time, a person was checking and scoring for sand fly host landing, probing or successful blood-feeding. The site of blood-feeding was recorded to detect possible skin lesions in the area. After 1 hour, blood-fed female sand flies were dissected and their guts checked microscopically at 400× to confirm the presence of *Leishmania* promastigotes. The number of bites or attempts of bites received by each animal was documented.

Leishmania infection follow-up

Clinical examination and weight were recorded weekly in all animals. Animals were anaesthetized with ketamine

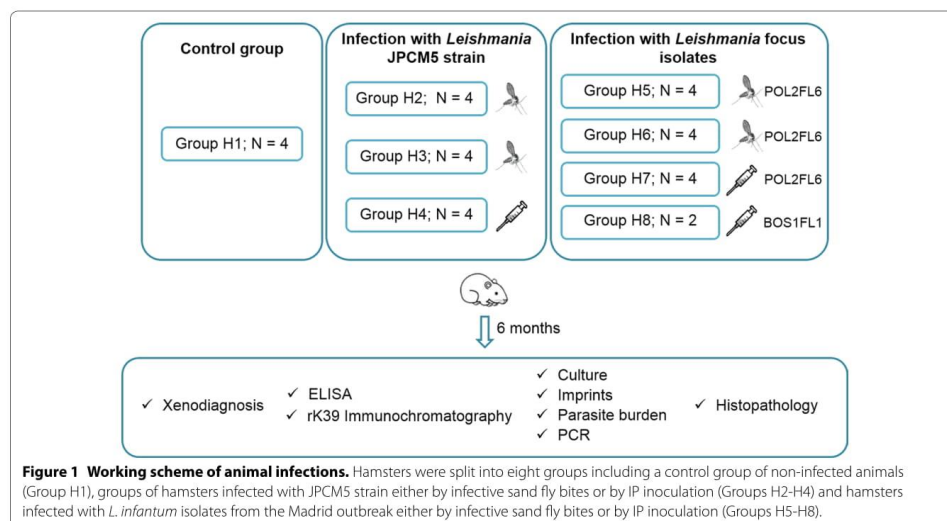


Table 1 Experimental infections of *P. perniciosus* with *L. infantum* parasites.

N° experiment	<i>Leishmania</i> strain or isolate	Infective mixture (parasites/mL)	Fed flies (%) ^a	Flies transferred to pots (%) ^b	Surviving flies after oviposition (%) ^c	Positive flies (%) ^d
1	JPCM5	2.5×10^8	395/500 (79.0)	332/395 (84.1)	220/332 (66.3)	72/100 (72.0)
2	JPCM5	2.5×10^8	425/500 (85.0)	216/425 (50.8)	196/216 (90.7)	88/96 (91.7)
3	POL2FL6	2.5×10^7	317/500 (63.4)	240/317 (75.7)	150/240 (62.5)	18/21 (85.7)
4	POL2FL6	2.5×10^7	303/500 (60.6)	151/303 (49.8)	17/151 (11.3)	15/17 (88.3)

^a Blood-fed sand flies/exposed sand flies $\times 100$ ^b Flies transferred to pots/blood-fed sand flies $\times 100$ ^c Flies that survived oviposition/flies transferred to pots $\times 100$ ^d *Leishmania* positive sand flies/dissected sand flies $\times 100$

and euthanized by cardiac exsanguination at 6 months after challenge. Sera were collected and stored at -20°C until use.

Animal necropsy was performed under sterile conditions. Liver and spleen were aseptically removed and weighed. These organs were cut into several portions that were used for the different protocols tested (culture and parasite burden, impression smears, histology or PCR).

Culture, parasite burden and Giemsa-stained imprint preparation

Reserved portions of tissues were homogenized in NET-10 (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl; pH 8.0) and passed through a cell strainer of $0.45\ \mu\text{m}$ (Corning, Durham, NC). Cell suspension was cultured in NNN tubes at 27°C that were checked weekly up to 4 weeks for promastigote detection under the microscope. Parasite burden was estimated by limit dilution assay [42]. Briefly, homogenized tissues were three-fold serially diluted with supplemented RPMI in microtiter culture plates containing a slant of NNN medium. Samples were cultured in duplicates and 24 dilutions were done. Plates were sealed and incubated at 27°C and after 7 days, wells were examined for motile promastigote presence using an inverted microscope. Parasite burden was expressed as the number of parasites per mg of tissue, considering that the last positive dilution contained at least one living parasite. Impression smears were Giemsa-stained and examined at 1000X under the microscope.

Leishmania infantum DNA detection by PCR

For PCR experiments, genomic DNA from 25 mg of spleen and liver tissues was extracted using the DNeasy® Blood and Tissue Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. *Leishmania* DNA was detected by kDNA PCR reaction which is based on the amplification of a 120 bp region of kinetoplastid DNA, as described elsewhere [43]. kDNA is an excellent target for *Leishmania* spp. detection that

provides high sensitivity. Two hundred ng of DNA were used as the template and the following primers were used: JW11 (5'-CCTATTTTACACCAACCCAGT-3') and JW12 (5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3'). Reliability of the technique was ensured including negative and positive controls in all molecular steps. Negative controls consisted of PCR reaction tubes both without DNA or DNA belonging to non-infected animals (Group H1). As a positive control, 60 pg of genomic DNA extracted from JPCM5 *L. infantum* strain was used. PCR products were separated on Pronasafe 1.5% agarose gels (Conda, Spain) and visualized under a UV transilluminator.

Xenodiagnosis

Infectivity of hamsters was assessed by xenodiagnosis as previously described [38]. Briefly, anaesthetized animals were individually exposed to 100 five to eight-day-old *P. perniciosus* females. Blood-fed sand flies were separated and maintained in adult cages under controlled conditions of humidity, temperature and photo-period for 5 days to allow transformation of potential amastigotes into promastigotes. Midgut dissections were carried out and sand fly infection status was determined by microscopy. Animals infected with JPCM5 strain and BOS1FL1 isolate were xenodiagnosed before sacrifice (6 months after challenge). In the case of 11 hamsters infected with POL2FL6 isolate, infectivity was thoroughly investigated and xenodiagnosis was performed at 2, 4 and 6 months.

Histopathology of POL2FL6 infected hamsters

After necropsy, all tissues were formalin-fixed, and selected bone tissue was decalcified with acetic acid. Tissue Sections. ($3\ \mu\text{m}$ thick) were performed from salivary glands, stomach, small and large intestine, mesentery lymph nodes, heart, lung, kidney, adrenal glands, liver, spleen, brain, bone marrow, skin and genital tracts. In the case of skin, samples were taken from the abdomen. After hematoxylin and eosin staining, slides were examined for

pathological lesions and the presence and quantification of *Leishmania* amastigotes. The parameters were scored as 0: no amastigote detection; 1: amastigotes hardly seen in localized areas; 2: more abundant presence of amastigotes, generally associated with other lesions such as granulomas or calcium agglomerates and 3: severe *Leishmania* parasitization.

Leishmania serology

Specific anti-*L. infantum* IgG antibody response generated by the analyzed animals was measured by ELISA as described elsewhere [44]. Soluble *Leishmania* antigen (SLA) was prepared from *L. infantum* promastigotes (JPCM5 strain). Parasites were treated with lysis buffer (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1.6 mM PMSF and 0.5% protease inhibitor cocktail (Calbiochem); pH = 8) and disrupted by cavitation pump. Cell debris was spun down (27 000 g, 20 min followed by 100 000 g, 4 h) and the protein content of the supernatant was determined by the Bradford method. Plates were coated with 1 µg of SLA per well. Sera were diluted 1/200 in 0.1% BSA 0.3% PBS-Tween and peroxidase-conjugated goat anti-hamster IgG (1:2000, Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) was used. The enzymatic reaction was developed by orthophenyldiamine (0.5 mg/mL) in McIlwain phosphate citrate buffer (pH 5.5) in the presence of 0.001% (v/v) of H₂O₂ (30%). Experiments were repeated at least twice. Serum dilutions from infected hamsters were considered positive when the mean of duplicate well values was greater than the cut off, calculated as the mean of the optical densities (OD) from sera of 33 negative hamsters plus 3 times the standard deviation.

In addition, rK39 immunochromatographic tests (Kalaria Detect® Human Rapid Test; InBios, Seattle, WA, USA) were performed with sera of hamsters following manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

Analyses were done using Prism program version 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and statistical significance was set as *p* value <0.05. Comparison between sets of groups was achieved by the non-parametric Mann-Whitney U test.

Results

Sand fly infections and transmission experiments

Each sand fly experimental infection was initiated with 500 *P. perniciosus*. The information regarding sand fly infection experiments including *Leishmania* strains, blood-feeding rates, number of sand flies transferred to oviposition pots, survival and infection rates is summarized in Table 1.

Experimental infections of *P. perniciosus* were achieved with infective mixtures of *L. infantum* promastigotes

and rabbit blood at a final concentration of 2.5×10^8 parasites/mL as a standard procedure in our laboratory. Infected flies with JPCM5 strain were successful in a second blood-feeding, midgut dissections showing that promastigotes had invaded the stomodeal valve and the presence of abundant metacyclic promastigotes was observed. For POL2FL6 isolate, infectious doses of 2.5×10^8 resulted in such a heavy infection that sand flies were not able to take a second blood meal. Therefore, a final concentration of 2.5×10^7 parasites/mL was chosen for transmission experiments with POL2FL6 isolate. *P. perniciosus* infections with POL2FL6 isolate were successful as determined by massive colonization of the complete midgut including a stomodeal valve with metacyclic promastigote presence. However, many massively infected flies with POL2FL6 were still unable to take blood from hamsters, leading to a lower number of bites in animals bitten by POL2FL6-infected sand flies when compared to animals bitten by JPCM5-infected sand flies (Table 2). When working with POL2FL6 isolate, three hamsters were bitten by an individual sand fly with confirmed blood meal under the microscope. Four hamsters received long time probing of infected flies without a successful blood meal. This situation was classified as attempts of biting. There was one hamster that did not receive any bite or attempt of biting (Group H6); therefore, it was excluded from the transmission experiment.

Evolution of hamster infection with JPCM5 strain and outbreak isolates

Establishment of infection of *L. infantum* was achieved with JPCM5 strain (5/12 animals; 41.7%) and outbreak isolates (10/13 animals; 76.9%) by both routes of infection. Weekly clinical examination showed different degrees of severity according to *Leishmania* strain and infection route. Animals inoculated or transmitted by bite with JPCM5 strain did not show any clinical signs including weight loss during the post-infection period. Conversely, hamsters infected with POL2FL6 or BOS1FL1 isolates exhibited an apparent clinical worsening during the follow-up period, with the onset of the disease faster in the case of inoculated animals as noted by the severity of weight loss in some cases. Concretely, infected animals with outbreak isolates gained weight at a markedly slower rate than the control group. At approximately 10 weeks, animal weight reached a plateau after which infected animals with outbreak isolates sustained their weight or started to drop in the IP inoculated animals reaching weight-loss values of 25.6% (Figure 2A).

Hamsters infected with outbreak isolates showed signs of infection such as skin scaling or appearance of skin lesions affecting paws, mouth and snout (Figures 2B, C, and D). At necropsy, no pathological findings were

Table 2 Data of experimentally infected hamsters.

Group	Transmission route	<i>Leishmania</i> strain or isolate	No. of exposed sand flies ^a	No. of infective bites (%) ^b	Culture		Parasite burden ^c	
					Spleen	Liver	Spleen	Liver
H1	Control	X	X	X	–	–	–	–
			X	X	–	–	–	–
			X	X	–	–	–	–
			X	X	–	–	–	–
H2	Bite	JPCM5	55	14/55 (25.5%)	+	–	–	95
			55	13/55 (23.6%)	–	–	4 × 10 ²	–
			55	16/55 (29.1%)	–	–	–	–
			55	14/55 (25.5%)	–	–	–	–
H3	Bite	JPCM5	49	25/49 (51.0%)	+	–	–	–
			49	21/49 (42.9%)	–	–	–	–
			49	14/49 (28.6%)	–	–	–	–
			49	14/49 (28.6%)	–	+	–	3.1 × 10 ³
H4	IP	JPCM5	X	X	+	–	2.6 × 10 ²	–
			X	X	–	–	–	–
			X	X	–	–	–	–
			X	X	–	–	–	–
H5	Bite	POL2FL6	25	1 Attempt	–	–	–	–
			25	1 Attempt	–	–	–	–
			25	>5 Attempts	–	–	3.3 × 10 ⁵	2.9 × 10 ⁴
			25	3 Attempts	+	+	8.8 × 10 ¹²	2.0 × 10 ¹⁰
H6	Bite	POL2FL6	25	1/25 (4.0%)	+	–	6.5 × 10 ⁵	6.7 × 10 ⁸
			25	1/25 (4.0%)	–	–	1.3 × 10 ⁴	–
			17	1/17 (5.9%)	–	–	–	–
H7	IP	POL2FL6	X	X	+	+	2.3 × 10 ¹³	2.1 × 10 ¹²
			X	X	+	+	3.9 × 10 ¹¹	5.3 × 10 ¹⁰
			X	X	+	+	2.4 × 10 ¹³	1.9 × 10 ¹²
			X	X	+	+	6.4 × 10 ¹²	5.9 × 10 ¹¹
H8	IP	BOS1FL1	X	X	+	+	3.2 × 10 ¹²	9.3 × 10 ¹⁰
			X	X	+	+	6.3 × 10 ¹³	5.9 × 10 ¹²

^a The number of sand flies used for *Leishmania* challenge depended on the amount of female flies that survived oviposition. Survival flies were divided into cages where animals were placed for challenge

^b The number of infective bites that each animal received is calculated as the number of flies that took a blood meal and was shown to be infected by *Leishmania*, as checked under the microscope, divided by the number of exposed flies × 100

^c Parasite burden is expressed as the number of parasites per gram of tissue

recorded in animals infected with JPCM5. On the contrary, most of the hamsters infected with the outbreak isolates presented severe splenomegaly when compared to spleens from uninfected animals (Figures 3A–C). Spleen was often found fibrotic with pale indurations (Figure 3B). Hepatomegaly was only observed in the most severe cases of hamsters infected with outbreak isolates, although the difference among groups was not statistically significant (Figure 3A).

In animals infected with JPCM5 strain, parasites were visualized in the spleen or liver of 41.7% of hamsters by imprints, culture and/or limit dilution assay yielding low parasitic loads. Kinetoplast DNA PCR confirmed the

culture results. Conversely, *Leishmania* parasites were detected by culture, limit dilution assay, tissue imprints (Figure 3D) or PCR in most of the animals infected with the outbreak isolates (76.9%), which presented two-to-six fold greater parasitic loads than animals infected with JPCM5 (Table 2). In certain cases and using the same samples, parasites did not grow in cultures but were detected by limit dilution assay (i.e. H6 group) which could be a matter of better environmental growth conditions in the microtiter wells rather than in the 10 mL tubes.

Regarding *Leishmania* serology, the average readout of negative control hamsters sera was 0.12 and the cut off level was set at an OD of 0.53. None of the sera from

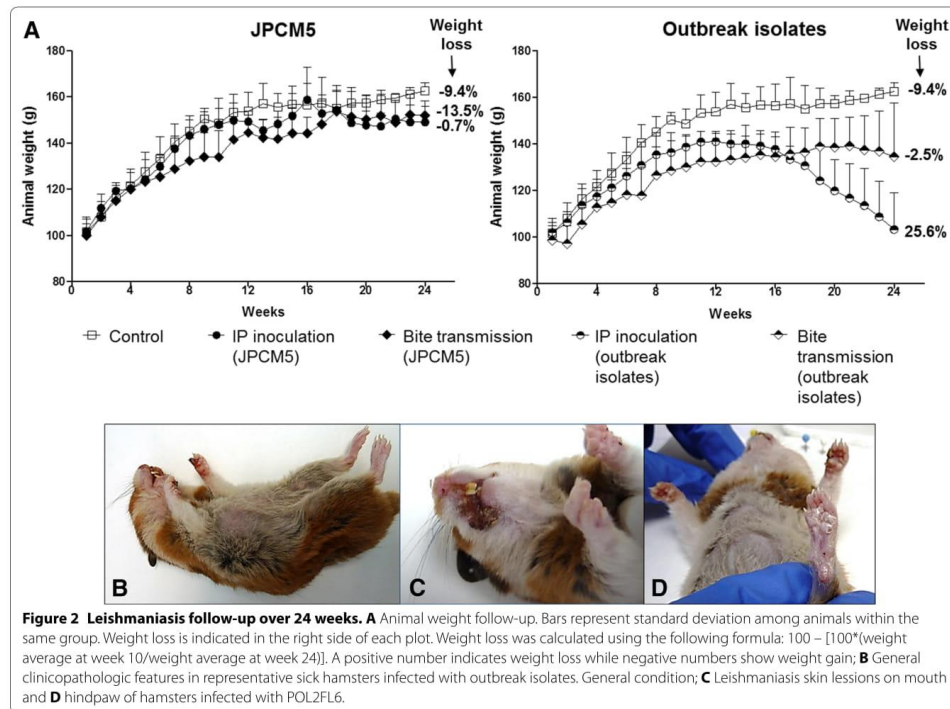


Figure 2 Leishmaniasis follow-up over 24 weeks. **A** Animal weight follow-up. Bars represent standard deviation among animals within the same group. Weight loss is indicated in the right side of each plot. Weight loss was calculated using the following formula: $100 - [100 \times (\text{weight average at week 10} / \text{weight average at week 24})]$. A positive number indicates weight loss while negative numbers show weight gain; **B** General clinicopathologic features in representative sick hamsters infected with outbreak isolates. General condition; **C** Leishmaniasis skin lesions on mouth and **D** hindpaw of hamsters infected with POL2FL6.

hamsters infected with JPCM5 strain presented specific IgG against the *Leishmania* protein extract (SLA). Nevertheless, 69.2% of the animals infected with the outbreak isolates (Groups H5-H8) showed levels of anti-*Leishmania* antibodies above the cut off level (Figure 3E). This positive humoral response correlated with the direct diagnosis in most of the cases (88.9%). Immunochromatography tests (rk39) were conducted with hamster sera performing high specificity (100%) when compared to SLA ELISA results. None of the JPCM5 infected animals showed a positive rk39 test while 6/13 (46.2%) of hamsters infected with the outbreak isolates exhibited a positive rk39 test. Therefore, sensitivity decreased to 66.7% when compared to ELISA results. Faint recognition bands were observed even with sera that had shown high levels of anti-*Leishmania* antibodies in ELISA (i.e. H7.2: OD₄₉₂ = 2.2; H8.1: OD₄₉₂ = 2.5 and H8.2: OD₄₉₂ = 1.9).

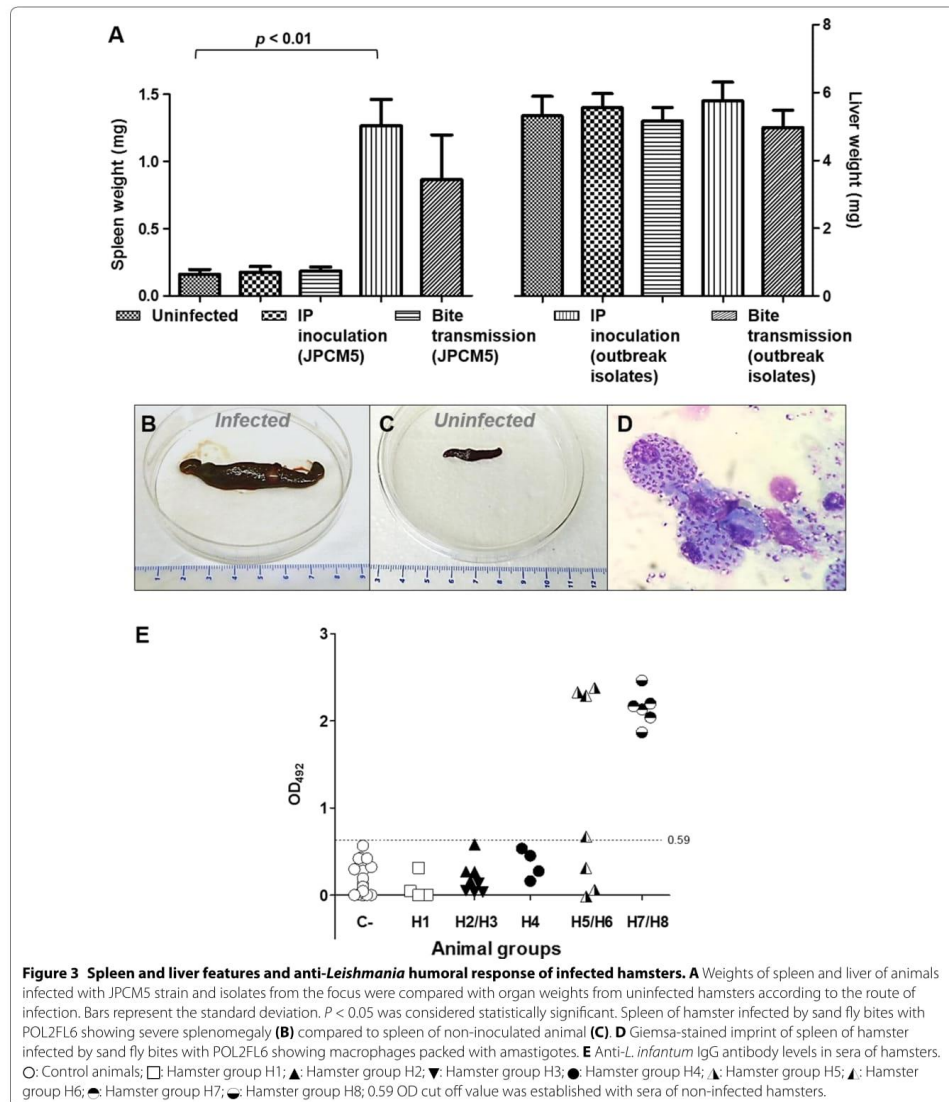
Xenodiagnosis follow-up

A total of 37 xenodiagnostic studies were carried out. Intraperitoneal inoculated hamsters with JPCM5 strain

were not able to infect any sand fly by xenodiagnosis. Conversely, hamsters infected with the outbreak isolates yielded positive results in 100% of animals IP inoculated and 43% of animals transmitted by bites. In the xenodiagnostic follow-up study, 30% of the animals infected with POL2FL6 were infective to sand flies as soon as two months post-infection. The number of positive sand flies increased over the study timeline (2–4–6 months), reaching values of 44.4% in the case of a hamster transmitted with POL2FL6 by sand fly bites (Table 3; Figures 4 and 5).

Histopathology

Leishmania amastigotes were found in several tissues of hamsters infected with POL2FL6 isolate including salivary glands, stomach, small and large intestine, mesenteric glands, lung, kidney, adrenal glands, liver, spleen, brain, bone marrow, skin and reproductive organs of hamsters. Infected inflammatory cells full of amastigote forms within the cytoplasm were abundant in the liver, spleen, bone marrow and lymphoid tissues such as mesenteric glands or Peyer's patches. Hepatic



granulomas were present in all of the animals studied and even when amastigotes were not observed (Table 4). Granulomas and amastigote nets were also found in reproductive organs both in male and female hamsters. Amastigotes were visualized in prostatic interstice,

epididymis interstice and epithelium of seminal vesicle of male inoculated animals. Moreover, granulomas with amastigotes were found in utero. Inoculated animals and some hamsters transmitted by sand fly bites showed a high degree of parasite dissemination (Table 4; Figure 6).

Table 3 Xenodiagnosis of infected hamsters.

Hamster code	<i>Leishmania</i>	Transmission route	Time post-infection (months)	Engorged flies (%) ^a	Dissected flies (%) ^b	Positive flies (%) ^c	Parasites in s.v. (%) ^d
H4.1	JPCM5	IP	6	94/100 (94)	65/94 (69.1)	0	–
H4.2	JPCM5	IP	6	81/100 (81)	70/81 (86.4)	0	–
H4.3	JPCM5	IP	6	87/100 (87)	65/87 (74.7)	0	–
H4.4	JPCM5	IP	6	90/100 (90)	63/90 (70.0)	0	–
H5.1	POL2FL6	Bite	2	90/100 (90)	66/90 (73.3)	0/66 (0)	–
			4	81/100 (81)	73/81 (90.1)	0/73 (0)	–
			6	100/100 (100)	87/100 (87.0)	0/87 (0)	–
H5.2	POL2FL6	Bite	2	82/100 (82)	55/82 (67.1)	0/55 (0)	–
			4	81/100 (81)	64/81 (79.0)	0/64 (0)	–
			6	99/100 (99)	79/99 (79.8)	0/79 (0)	–
H5.3	POL2FL6	Bite	2	100/100 (100)	54/100 (54.0)	2/54 (3.7)	2/2 (100%)
			4	84/100 (84)	72/84 (85.7)	4/72 (5.6)	4/4 (100%)
			6	93/100 (93)	71/93 (76.3)	5/71 (7.0)	4/5 (80.0%)
H5.4	POL2FL6	Bite	2	87/100 (87)	67/87 (77.0)	1/67 (1.4)	1/1 (100%)
			4	88/100 (88)	77/88 (87.5)	7/77 (9.1)	7/7 (100%)
			6	99/100 (99)	81/99 (81.8)	36/81 (44.4)	33/36 (91.7%)
H6.1	POL2FL6	Bite	2	96/100 (96)	67/96 (69.8)	0/67 (0)	–
			4	46/100 (46)	39/46 (84.8)	0/39 (0)	–
			6	100/100 (100)	86/100 (86.0)	1/86 (1.2)	1/1 (100%)
H6.2	POL2FL6	Bite	2	90/100 (90)	67/90 (74.4)	0/67 (0)	–
			4	90/100 (90)	28/90 (31.1)	0/28 (0)	–
			6	95/100 (95)	69/95 (68.4)	0/69 (0%)	–
H6.3	POL2FL6	Bite	2	98/100 (98)	81/98 (82.7)	0/81 (0)	–
			4	99/100 (99)	89/99 (89.9)	0/89 (0)	–
			6	99/100 (99)	86/99 (86.8)	0/86 (0)	–
H7.1	POL2FL6	IP	2	92/100 (92)	53/92 (57.6)	4/53 (7.5)	4/4 (100%)
			4	92/100 (92)	33/92 (35.9)	3/33 (9.1)	2/3 (66.7%)
			6	100/100 (100)	83/100 (83.0)	21/83 (25.3)	5/21 (23.8%)
H7.2	POL2FL6	IP	2	72/100 (72)	28/72 (38.9)	0/28 (0)	–
			4	97/100 (97)	92/97 (94.8)	17/92 (18.5)	9/17 (52.9%)
			6	89/100 (89)	62/89 (69.7)	13/62 (21.0)	11/13 (84.6%)
H7.3	POL2FL6	IP	2	92/100 (92)	39/92 (42.2)	0/39 (0)	–
			4	71/100 (71)	59/71 (83.1)	4/59 (6.8)	3/4 (75.0%)
			6	91/100 (91)	81/91 (89.0)	23/81 (28.4)	19/23 (82.6%)
H7.4	POL2FL6	IP	6	96/100 (96)	72/96 (75.0)	3/72 (4.2)	0 (0%)
H8.1	BOS1FL1	IP	6	94/100 (94)	93/94 (98.9)	11/93 (11.8)	5/11 (45.5%)
H8.2	BOS1FL1	IP	6	97/100 (97)	83/97 (85.6)	15/83 (18.1)	6/15 (40.0%)

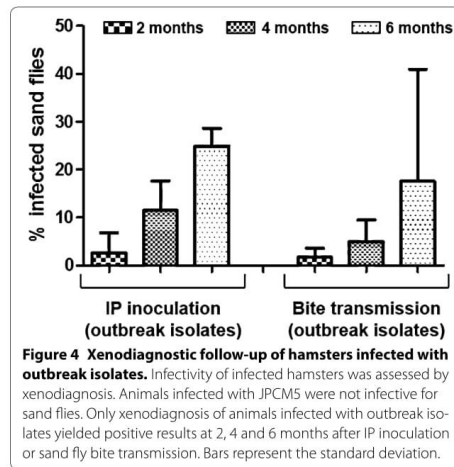
Metacyclic promastigotes were observed in s. v. of all sand flies examined

^a Blood-fed sand flies/exposed sand flies × 100^b Dissected sand flies/total fed flies × 100^c *Leishmania* positive sand flies/dissected sand flies × 100^d Maturity of infection is estimated as the percentage of sand flies with promastigotes in the stomodeal valve (s. v.)

Besides some degree of calcium deposition was observed in tissues from the non-infected hamster, agglomerates were frequently seen in most of infected analyzed tissues as a sign of infection and amastigote nests were usually found nearby.

Discussion

The high virulence of two *L. infantum* isolates that are circulating in the Madrid LV outbreak was stressed using a hamster model. Establishment of infection of *L. infantum* was achieved with JPCM5 strain and



outbreak isolates both by *P. perniciosus* infective bites or IP route. However, virulence of outbreak isolates was highlighted by the worse clinical outcome of disease, higher parasite detection in the spleen and liver, greater parasitic loads and positivity of *Leishmania* serology when compared with hamsters infected with JPCM5 strain.

Natural transmission models are crucial for studying immunological processes of leishmaniasis disease. The need for developing these models was clearly evident when vaccination protected mice against needle challenge but failed to protect animals against infected sand fly challenge [45, 46]. In this case, a natural *Leishmania* transmission model helped us to confirm the great virulence of outbreak isolates that was also observed with IP inoculation. However, a better standardization of the natural model is required for future use. More precisely, the number of parasites for sand fly infections should be titrated for sand fly infections and lower concentrations should be selected. Besides, implementing

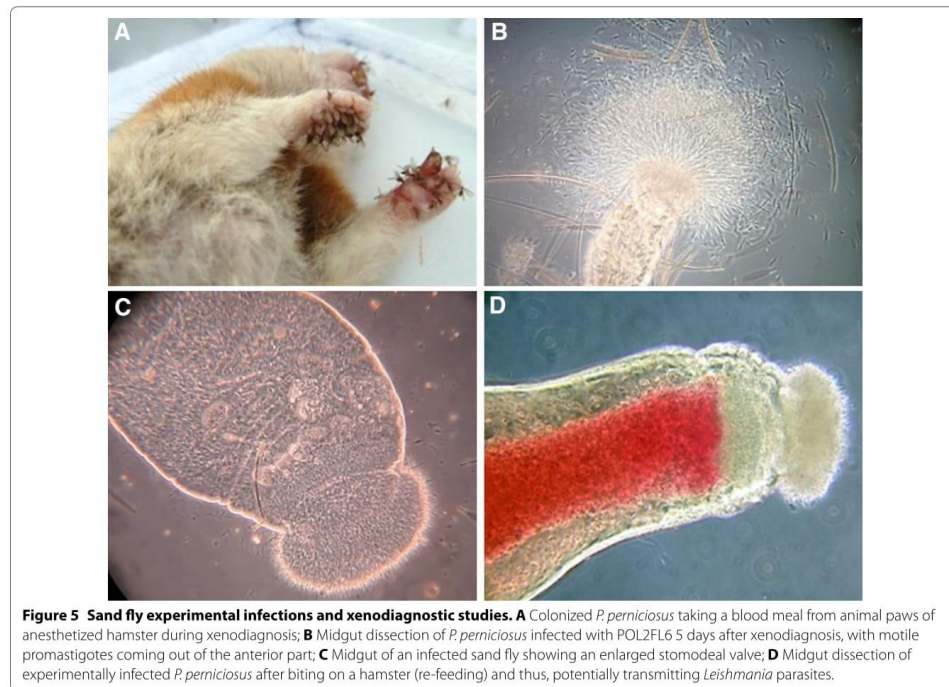
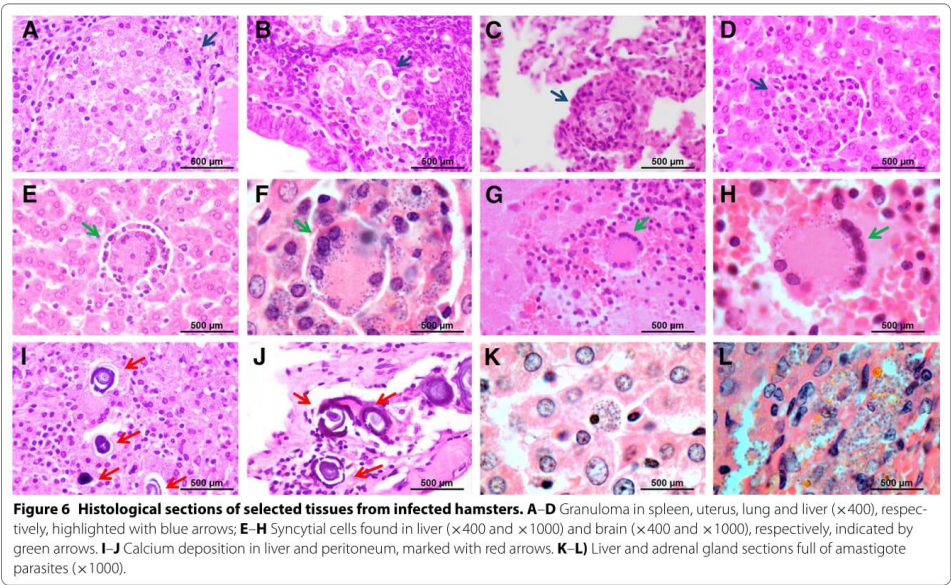


Table 4 Histopathology of several POL2FL6 infected hamsters.

Tissue	Negative control	H5.3	H5.4	H6.1	H6.2	H6.3	H7.1	H7.2	H7.3
Salivary glands	0	ND	1	0	ND	0	1	1	0
Stomach	0	ND	2	0	ND	0	2	2	1
Small intestine	0	ND	2	0	0	0	2	2	2
Large intestine	0	ND	1	0	0	0	1	1	1
Mesenteric ganglion	0	ND	3	0	0	0	3	3	3
Heart	0	ND	0	0	0	0	0	0	0
Lung	0	ND	1	0	0	0	1	1	1
Kidney	0	ND	0	1	0	0	1	1	1
Adrenal gland (cortex)	0	ND	2	0	0	0	1	1	1
Liver	0	0	3	0	0	0	3	3	3
Spleen	0	0	3	0	0	0	3	3	3
Pancreas	0	ND	0	0	0	0	0	0	0
Brain	0	ND	0	0	0	0	1	1	0
Bone marrow	0	ND	3	0	0	ND	ND	ND	ND
Skin	0	ND	1	0	0	0	ND	0	ND
Reproductive organs	0	ND	3	0	0	0	2	1	1

Negative control corresponds to a non infected hamster. H5.3, H5.4: Group 5, hamsters 3 and 4 (*Leishmania* vector-initiated infection). H6.1, H6.2, H6.3: Group 6, hamsters 1, 2 and 3 (*Leishmania* vector-initiated infection). H7.1, H7.2, H7.3: Group 7, hamsters 1, 2 and 3 (*Leishmania* intraperitoneal inoculation)
ND, not determined; 0, no amastigote detection; 1, amastigotes hardly seen in localized areas; 2, more abundant presence of amastigotes, generally associated with other lesions such as granulomas or calcium agglomerates and 3, severe *Leishmania* parasitisation



posttransmission scoring and metacyclic abundance determination would be useful to assess the rate of mature infection within a group.

Noteworthy, the entire *L. infantum* cycle was accomplished under laboratory conditions. Therefore, parasites originally isolated from collected sand flies in the field

were used to infect hamsters through the bite of experimentally infected colonized *P. perniciosus*. Moreover, parasites were recovered by sand flies by xenodiagnosis.

Our results indicate that infection by syringe is more consistent than transmission by bite. In the case of the outbreak isolates, intraperitoneal inoculation led to severe clinical outcome in all animals (Groups H7 and H8). However, in animals infected by sand fly bites, disease development was more variable showing different degrees of clinical signs (Groups H5 and H6). This variability can be considered a more accurate reflection of what occurs in nature and it has already been described in hamsters infected with *Leishmania chagasi* by the bite of infected *L. longipalpis* [28]. This unpredictable outcome of clinical disease may be related to the individual variability of *Leishmania* doses ejected by infected sand flies [10, 11]. Furthermore, Kimblin et al. [10] correlated a rapid development of large lesions in the ears of mice that received the high-dose inoculum (5.6×10^3 promastigotes).

Under laboratory conditions, natural transmission experiments are mainly hampered since the majority of sand flies die after oviposition in the laboratory [47]. Survival rates were improved by delaying to 5 days the time after blood-feeding before transferring the sand flies to oviposition pots. Experimental infections of *P. perniciosus* with both JPCM5 strain and POL2FL6 isolate resulted in heavy infections with metacyclic promastigotes blocking the stomodeal valve. However, several differences in terms of infection status were found. Sand fly infections with POL2FL6 isolate were massive; midguts were packed with great numbers of highly motile promastigotes and stomodeal valves were completely blocked. Those heavily infected sand flies were unable to re-feed but one bite or even attempts of biting without imbibing blood were sufficient for transmission with POL2FL6 isolate. *Leishmania* is known to modify sand fly biting behavior. Such interference in feeding behavior results in a greater number of bites by females attempting to take blood, thus favoring the transmission chances to a higher number of hosts in nature [15, 18]. Parasite transmission only by probing sand flies has been demonstrated for CL [18, 19, 47–49] as well as for VL [50].

We would like to remark that the differences found in midgut colonization should be considered for further investigation, since the massive colonization of outbreak isolates can determine the vector capacity. Moreover, massive colonization of midgut and stomodeal valve was also observed in natural infections from field sand flies collected in the outbreak area (unpublished observations).

Regarding *Leishmania* serology, in most of the cases infection with the outbreak isolates elicited a high titer of specific IgG. However, rk39 immunochromatography

performed with the same sera resulted in a lower sensitivity compared to the ELISA tests (66.7%). Even sera showing high titers of IgG anti-SLA gave faint bands in the rk39 immunochromatography commercial tests. This might be due to the slight binding affinity of protein A to the Fc receptor of hamster IgG [51].

Due to the high virulence observed in POL2FL6 isolate a deeper insight into the dissemination process of these parasites in different vertebrate tissues was gained. Histopathology studies confirmed the wide spread of POL2FL6 parasites. Spleen, liver, bone marrow and lymph nodes were found highly parasitized. These organs are largely known to be involved in leishmaniasis pathology [52]. On the contrary, amastigote forms were found in other not so common or less studied locations such as salivary glands, stomach, intestine, mesenteric glands, lung, kidney, adrenal glands, brain and reproductive organs of the hamster. The presence of amastigotes in renal, gastrointestinal and respiratory systems has been described [52–54] and even in the central nervous system of experimentally infected hamsters and naturally infected dogs [55, 56]. Surprisingly, parasites were found in the skin of only one animal. Taking into consideration that hamsters infected with POL2FL6 isolate gave high rates of infected sand flies as evaluated by xenodiagnosis, visualization of parasites was expected in all skin samples. Future studies are planned to further investigate the dissemination of different parasite strains along the skin and its relationship with sand fly infectiousness.

Transmission by bite of POL2FL6 isolate generated a slower progression of clinical disease than IP infection providing a better reflection of the chronicity that takes place in nature. However, both groups were infective to *P. perniciosus* by xenodiagnosis as soon as 2 months post-infection. Conversely, hamsters inoculated with JPCM5 were not infective to sand flies. In our experiments, the capability to transmit *Leishmania* parasites from infected animals to sand flies is related to the disease progression. This relationship between clinical severity and proportion of infectious dogs has been widely reported [57]. Similarly, hamsters showing worse clinical conditions exhibited higher infectivity rates to sand flies. Moreover, this association was clearly demonstrated as the infectiousness of hamsters infected by POL2FL6 to sand flies increased over time reaching values of 44.4% for a vector-initiated infection.

POL2FL6 isolate produced massive infections in sand flies, and both BOS1FL1 and POL2FL6 caused severe clinical manifestations in hamsters. Animals infected with the outbreak isolates exhibited high infectiousness to sand flies. Therefore, this result supports the great virulence of the two studied *Leishmania* isolates that are circulating in the focus of VL in Madrid. So far, molecular

characterization of *Leishmania* isolates from the focus share the same ITS genotype as the strain MHOM/ES/87/LOMBARDI [58]. LOMBARDI strain was initially isolated in 1987 from a CL patient in Spain (region unknown). Chicharro et al. typed human *Leishmania* isolates to get an epidemiologic picture of two periods (before: 1988–2005 and during the outbreak: 2008–2012) and found out that this genotype has been circulating in Madrid since at least 1992 [58]. This is the only ITS type found in isolates from all human cases associated with this outbreak. Besides human cases, ITS-LOMBARDI is also present in field sand flies and in hares and rabbits from the focus area. This genotype has been found both in isolates from CL and VL patients [58]. Therefore, no specific tropism has been assigned to this ITS genotype. Recently, virulence of *L. infantum* isolates from *P. perniciosus* captured in the focus area was highlighted using an ex vivo model [59]. These authors showed that BOS1FL1 and POL2FL7 isolates displayed high virulence in terms of infection rates of murine macrophages and dendritic cells, cytokine production and enzymatic activities, undermining host immune defense mechanisms. The experiments included in this study with in vivo natural transmission models serve to complement the ex vivo analyses. The high virulence of these isolates is consistent with the outbreak of leishmaniasis of Madrid and could explain its magnitude, since it is considered the largest focus of VL described in Europe so far.

This natural infection model allowed us to compare *Leishmania* strain virulence and infectivity to sand flies. The virulence of isolates that are circulating in the focus of leishmaniasis in Madrid has been highlighted by the worse clinical outcome of disease, higher parasitic loads in spleen and liver and positivity of *Leishmania* serology when compared with hamsters infected with JPCM5 strain. Histopathological studies confirmed the wide spread of POL2FL6 parasites to several organs of hamsters and only animals infected with outbreak isolates were infective to sand flies in xenodiagnostic studies. These findings would contribute to a better understanding of the epidemiology of the largest focus of VL in Europe.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: RM, MJ. Performed the experiments: IMM, RM, MJ, CE. Collaborated and supported on performance of the tests: EG. Analyzed the data: IMM. Wrote the final manuscript: IMM, MJ, RM. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was partially funded by the Spanish Ministry of Science & Innovation (Project AGL2008-01592) and by the EU grant FP7-2011-261504 EDENext. The paper is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext372. We would like to thank the Veterinary Unit (ISCIII) for animal handling,

Histopathology Unit (ISCIII) for histology sections preparation, Sonia Hernández for excellent sand fly rearing and Ancare Velasco for technical work.

We would like to dedicate this work to the memory of Cesar Eguiluz who sadly passed away during the course of revision of this paper.

Author details

¹ Unidad de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain. ² Unidad de Veterinaria, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain.

Received: 17 April 2015 Accepted: 5 October 2015

Published online: 09 December 2015

References

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, Leishmaniasis Control Team WHO (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7:e35671
- WHO (2010) Control of the Leishmaniasis. World Health Organization, Geneva, Tech Rep Ser no. 949
- Garg R, Dube A (2006) Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123:439–454
- Dea-Ayuela MA, Rama-Iniguez S, Alunda JM, Bolas-Fernandez F (2007) Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for in vivo testing of antileishmanial compounds. *Vet Res Commun* 31:703–717
- Requena JM, Soto M, Doria MD, Alonso C (2000) Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 76:269–281
- Loria-Cervera EN, Andrade-Narvaez FJ (2014) Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 56:1–11
- Nieto A, Dominguez-Bernal G, Orden JA, De La Fuente R, Madrid-Elena N, Carrion J (2011) Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet Res* 42:39
- Randolph SE, Nuttall PA (1994) Nearly right or precisely wrong? Natural versus laboratory studies of vector-borne diseases. *Parasitol Today* 10:458–462
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA (2004) Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of PPG. *Nature* 430:463–467
- Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, Fay MP, Kamhawi S, Sacks D (2008) Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10125–10130
- Maia C, Seblova V, Sadlova J, Votyska J, Volf P (2011) Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatotropic strain. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1181
- Secundino NF, Freitas VC, Monteiro CC, Pires AC, David BA, Pimenta PF (2012) The transmission of *Leishmania infantum chagasi* by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. *Parasit Vectors* 5:20
- Titus RG, Ribeiro JM (1988) Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239:1306–1308
- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL (1998) Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 188:1941–1953
- Rogers ME (2012) The role of *leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front Microbiol* 3:223
- Moreno I, Molina R, Toraño A, Laurín E, García E, Domínguez M (2007) Comparative real-time kinetic analysis of human complement killing of *Leishmania infantum* promastigotes derived from axenic culture or from *Phlebotomus perniciosus*. *Microb Infect* 9:1574–1580

17. Sacks DL, Melby PC (2015) Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. *Curr Protoc Immunol* 108:19.2.1–19.2.24
18. Beach R, Kiilu G, Leeuwenburg J (1985) Modification of sand fly biting behavior by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. *Am J Trop Med Hyg* 34:278–282
19. Svobodova M, Votupka J (2003) Experimental transmission of *Leishmania tropica* to hamsters and mice by the bite of *Phlebotomus sergenti*. *Microb Infect* 5:471–474
20. Kamhawi S, Belkaid Y, Modi G, Rowton E, Sacks D (2000) Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290:1351–1354
21. Gomes R, Teixeira C, Oliveira F, Lawyer PG, Elnaïem DE, Meneses C, Goto Y, Bhatia A, Howard RF, Reed SG, Valenzuela JG, Kamhawi S (2012) KSAC, a defined *Leishmania* antigen, plus adjuvant protects against the virulence of *L. major* transmitted by its natural vector *Phlebotomus duboscqi*. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1610
22. Abi Abdallah DS, Pavinski Bitar A, Oliveira F, Meneses C, Park JJ, Mendez S, Kamhawi S, Valenzuela JG, Marquis H (2014) A *Listeria*-based vaccine that secretes the sand fly salivary protein LJM11 confers long-term protection against vector-transmitted *Leishmania major*. *Infect Immun* 82:2736–2745
23. Teixeira C, Gomes R, Oliveira F, Meneses C, Gilmore DC, Elnaïem DE, Valenzuela JG, Kamhawi S (2014) Characterization of the early inflammatory infiltrate at the feeding site of infected sand flies in mice protected from vector-transmitted *Leishmania major* by exposure to uninfected bites. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2781
24. Lawyer PG, Githure JJ, Anjili CO, Olobo JO, Koech DK, Reid GD (1990) Experimental transmission of *Leishmania major* to vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) by bites of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84:229–232
25. Oliveira F, Rowton E, Aslan H, Gomes R, Castrovinci PA, Alvarenga PH, Abdeladhim M, Teixeira C, Meneses C, Kleeman LT, Kleeman LT, Guimaraes-Costa AB, Rowland TE, Gilmore D, Doumbia S, Reed SG, Lawyer PG, Andersen JF, Kamhawi S, Valenzuela JG (2015) A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates. *Sci Transl Med* 7:290ra90
26. Rioux JA, Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Young CJ, Turner DP, Lanotte G, Bailly M (1979) Ecology of leishmaniasis in the south of France. 11. Canine leishmaniasis: successful experimental transmission from dog to dog by the bite of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 (author's transl). *Ann Parasitol Hum Comp* 54:401–407 (in French)
27. Knechtli R, Jenni L (1990) Experimental transmission of *Leishmania infantum* by the bite of *Phlebotomus perniciosus* from Switzerland. *Acta Trop* 47:213–216
28. Lainson R, Ward RD, Shaw JJ (1977) Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature* 266:628–630
29. Pozio E, Maroli M, Gradoni L, Gramiccia M (1985) Laboratory transmission of *Leishmania infantum* to *Rattus rattus* by the bite of experimentally infected *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79:524–526
30. Aslan H, Dey R, Meneses C, Castrovinci P, Jeronimo SM, Oliva G, Fischer L, Duncan RC, Nakhasi HL, Valenzuela JG, Kamhawi S (2013) A new model of progressive visceral leishmaniasis in hamsters by natural transmission via bites of vector sand flies. *J Inf Dis* 207:1328–1338
31. Gonçalves MD, Ryan L, Lainson R, Shaw JJ (1985) The retained capacity of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) to transmit *Leishmania chagasi* (Cunha & Chagas) after eight years (64 generations) in a closed laboratory colony. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80:337–338
32. El Sawaf BM, Doha SA, Imam MI (2012) Transmission of *Leishmania infantum* MON-98 to hamsters by the bite of *Phlebotomus langeroni* Nitzulescu (Diptera: psychodidae). *Acta Trop* 121:44–46
33. Sadlova J, Seblova V, Votupka J, Warburg A, Volf P (2015) Xenodiagnosis of *Leishmania donovani* in BALB/c mice using *Phlebotomus orientalis*: a new laboratory model. *Parasit Vectors* 8:765
34. Arce A, Estirado A, Ordoñez M, Sevilla S, García N, Moratilla L, de la Fuente S, Martínez A, Pérez A, Aránguez E, Iriso A, Sevillano O, Bernal J, Vilas F (2013) Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009–2012. *Euro Surveill* 18:20546
35. Vilas F, Carpiñero J, Sevilla S, Martínez A, Ordoñez M, Bernal J, Díaz R, Iriso A, Sevillano O, Escacena C, De La Fuente S, Arce A, Estirado A, Frutos J, Fuster F (2012) Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. Medidas de investigación y control medioambiental. *Prof Vet* 17:6–15 (in Spanish)
36. Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Martín O, Cubero E, Molina R (2010) Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol* 169:327–334
37. Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S, Molina R (2014) Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet Parasitol* 202:296–300
38. Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal J (2012) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol* 190:268–271
39. Wellcome Trust Sanger Institute. <https://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/leishmania-infantum.html>. Accessed 12 Oct 2015
40. Denise H, Poot J, Jimenez M, Ambit A, Herrmann DC, Vermeulen AN, Coombs GH, Mottram JC (2006) Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. *BMC Mol Biol* 7:42
41. Molina R (1991) Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). *Res Rev Parasitol* 51:87–89
42. Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA (1985) A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol* 7:545–555
43. Jiménez M, González E, Iriso A, Marco E, Alegret A, Fuster F, Molina R (2013) Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol Res* 112:2453–2459
44. Carrillo E, Ahmed S, Goldsmith-Pestana K, Nieto J, Osorio Y, Travi B, Moreno J, McMahon-Pratt D (2007) Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 25:1534–1543
45. Rogers ME, Sizova OV, Ferguson MA, Nikolaev AV, Bates PA (2006) Synthetic glycovaccine protects against the bite of leishmania-infected sand flies. *J Infect Dis* 194:512–518
46. Peters NC, Kimblin N, Secundino N, Kamhawi S, Lawyer P, Sacks DL (2009) Vector transmission of *Leishmania* abrogates vaccine-induced protective immunity. *PLoS Pathog* 5:e1000484
47. Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Ready PD, Molyneux DH (1977) *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 196:105–115
48. Beach R, Kiilu G, Hendricks L, Oster C, Leeuwenburg J (1984) Cutaneous leishmaniasis in Kenya: transmission of *Leishmania major* to man by the bite of a naturally infected *Phlebotomus duboscqi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78:747–751
49. Hanafi HA, el Sawaf BM, Fryauff DJ, Modi GB, Presley SM (1996) Experimental infection and transmission of *Leishmania major* by laboratory-reared *Phlebotomus bergeroti* parrot. *Am J Trop Med Hyg* 54:644–646
50. Chung HL, Feng LC, Feng SL (1951) Observations concerning the successful transmission of kala-azar in North China by the bites of naturally infected *Phlebotomus chinensis*. *Peking Nat Hist Bull* 19:302–326
51. Richman DD, Cleveland PH, Oxman MN, Johnson KM (1982) The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species. *J Immunol* 128:2300–2305
52. Meleney HE (1925) The Histopathology of Kala-Azar in the Hamster, Monkey, and Man. *Am J Pathol* 1(147–168):111
53. Silva Junior GB, Barros EJ, Daher Ede F (2014) Kidney involvement in leishmaniasis—a review. *Braz J Infect Dis* 18:434–440
54. Martis N, Pomares C, Jeandel PY, Lazure T, Marty P, Rosenthal E (2015) Hepatopulmonary syndrome associated with visceral leishmaniasis. *Immunol Res* 61:169–171
55. Oliveira E, Oshiro ET, Pinto RV, Castro BC, Daniel KB, Oliveira JM, Junior MS, Guimaraes EB, Silva JM, Dorval ME (2011) Presence of amastigotes in the central nervous system of hamsters infected with *Leishmania* sp. *Rev Bras Parasitol Vet* 20:97–102
56. Márquez M, Pedregosa JR, López J, Marco-Salazar P, Fondevila D, Pumarola M (2013) *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. *J Vet Diagn Invest* 25:142–146
57. Quinnell RJ, Courtenay O (2009) Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136:1915–1934

58. Chicharro C, Llanes-Acevedo I, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I (2013) Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009–2012. *Euro Surveill* 18:20545
59. Domínguez-Bernal G, Jiménez M, Molina R, Ordoñez-Gutiérrez L, Martínez-Rodrigo A, Mas A, Cutuli M, Carrión J (2014) Characterisation of the ex vivo virulence of *Leishmania infantum* isolates from *Phlebotomus perniciosus* from an outbreak of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasit Vectors* 7:499

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH ARTICLE

Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*



Bulent Alten¹, Carla Maia², Maria Odete Afonso², Lenea Campino², Maribel Jiménez³, Estela González³, Ricardo Molina³, Anne Laure Bañuls⁴, Jorian Prudhomme⁴, Baptiste Vergnes⁴, Celine Toty⁴, Cécile Cassan⁴, Nil Rahola⁴, Magali Thierry⁴, Denis Sereno⁴, Gioia Bongiorno⁵, Riccardo Bianchi⁵, Cristina Khoury⁵, Nikolaos Tsirigotakis⁶, Emmanouil Dokianakis⁶, Maria Antoniou⁶, Vasiliki Christodoulou⁷, Apostolos Mazeris⁷, Mehmet Karakus⁸, Yusuf Ozbel⁸, Suha K. Arserim⁹, Ozge Erisoz Kasap¹, Filiz Gunay¹, Gizem Oguz¹, Sinan Kaynas¹⁰, Nikoloz Tsertsvadze¹¹, Lamzira Tskhvaradze¹¹, Ekaterina Giorgobiani^{11†}, Marina Gramiccia⁵, Petr Volf¹², Luigi Gradoni^{5*}

OPEN ACCESS

Citation: Alten B, Maia C, Afonso MO, Campino L, Jiménez M, González E, et al. (2016) Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*. PLoS Negl Trop Dis 10(2): e0004458. doi:10.1371/journal.pntd.0004458

Editor: Paul Andrew Bates, Lancaster University, UNITED KINGDOM

Received: June 9, 2015

Accepted: January 22, 2016

Published: February 22, 2016

Copyright: © 2016 Alten et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was partially funded by EU grant FP7-261504 EDENext and is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENext376 (<http://www.edenext.eu>). The work of CM was done under the fellowship SFRH/BPD/44082/2008 from Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Ministério da Educação e Ciência, Portugal. The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission. The funders had no role in

1 Department of Biology, Ecology Division, HUESRL-VERG laboratories, Hacettepe University, Ankara, Turkey, 2 Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Unidade Parasitologia Médica, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 3 Centro Nacional de Microbiologia, Servicio de Parasitología, Unidad de Entomología Médica, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain, 4 Institut de Recherche pour le Développement, MIVEGEC, Montpellier, France, 5 M.I.P.I. Department, Unit of Vector-borne Diseases and International Health, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, 6 Laboratory of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece, 7 Veterinary Services of Cyprus, Nicosia, Cyprus, 8 Department of Parasitology, Ege University, Izmir, Turkey, 9 Vocational School of Health Sciences, Cela Bayar University, Manisa, Turkey, 10 Veterinary Faculty, Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, Turkey, 11 National Center for Disease Control and Public Health, Tbilisi, Georgia, 12 Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

† Deceased.

* luigi.gradoni@iss.it

Abstract

Background

The recent geographical expansion of phlebotomine vectors of *Leishmania infantum* in the Mediterranean subregion has been attributed to ongoing climate changes. At these latitudes, the activity of sand flies is typically seasonal; because seasonal phenomena are also sensitive to general variations in climate, current phenological data sets can provide a baseline for continuing investigations on sand fly population dynamics that may impact on future scenarios of leishmaniasis transmission. With this aim, in 2011–2013 a consortium of partners from eight Mediterranean countries carried out entomological investigations in sites where *L. infantum* transmission was recently reported.

Methods/Principal Findings

A common protocol for sand fly collection included monthly captures by CDC light traps, complemented by sticky traps in most of the sites. Collections were replicated for more than

study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

one season in order to reduce the effects of local weather events. In each site, the trapping effort was left unchanged throughout the survey to legitimate inter-seasonal comparisons. Data from 99,000 collected specimens were analyzed, resulting in the description of seasonal dynamics of 56,000 sand flies belonging to *L. infantum* vector species throughout a wide geographical area, namely *P. perniciosus* (Portugal, Spain and Italy), *P. ariasi* (France), *P. neglectus* (Greece), *P. tobbi* (Cyprus and Turkey), *P. balcanicus* and *P. kandelakii* (Georgia). Time of sand fly appearance/disappearance in collections differed between sites, and seasonal densities showed variations in each site. Significant correlations were found between latitude/mean annual temperature of sites and i) the first month of sand fly appearance, that ranged from early April to the first half of June; ii) the type of density trend, varying from a single peak in July/August to multiple peaks increasing in magnitude from May through September. A 3-modal trend, recorded for *P. tobbi* in Cyprus, represents a novel finding for a *L. infantum* vector. Adults ended the activity starting from mid September through November, without significant correlation with latitude/mean annual temperature of sites. The period of potential exposure to *L. infantum* in the Mediterranean subregion, as inferred by adult densities calculated from 3 years, 37 sites and 6 competent vector species, was associated to a regular bell-shaped density curve having a wide peak center encompassing the July-September period, and falling between early May to late October for more than 99% of values. Apparently no risk for leishmaniasis transmission took place from December through March in the years considered. We found a common pattern of nocturnal females activity, whose density peaked between 11 pm and 2 am.

Conclusions

Despite annual variations, multiple collections performed over consecutive years provided homogeneous patterns of the potential behavior of leishmaniasis vectors in selected sites, which we propose may represent sentinel areas for future monitoring. In the investigated years, higher potential risk for *L. infantum* transmission in the Mediterranean was identified in the June-October period (97% relative vector density), however such risk was not equally distributed throughout the region, since density waves of adults occurred earlier and were more frequent in southern territories.

Author Summary

Recent projections on global warming indicate a constant rise of temperatures in the Mediterranean subregion in the near-mid future. While this phenomenon already caused geographical expansion of several arthropod-borne diseases, it is likely to affect also temporal parameters of seasonally transmitted diseases such as leishmaniasis, a protozoan infection spread by the bite of phlebotomine sand flies. Phenology of sand flies consists in the periods of emergence of adults and their disappearance from collections following an activity period during warm months, which can be characterized by peaks of abundance. Current phenological observations can be important for continuing investigations on sand fly dynamics that may impact on leishmaniasis transmission in the future. With this aim, partners from eight Mediterranean countries identified sites with documented *Leishmania infantum* transmission by six different vector species and performed multiannual trappings. From

the high number of 56,000 specimens collected throughout an area spanning from Portugal at west to Georgia at east, the current seasonal dynamics of Mediterranean vectors was obtained. Both, period of adults emergence and type of density trend were found to be significantly correlated with latitude or mean annual temperature of trapping sites. At the southernmost latitudes, vector activity started as early as begin of April and ended by late November, showing that the no-risk period of potential exposure to *L. infantum* lasted only 4 months.

Introduction

Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) are the unique haematophagous insects proven to transmit leishmaniasis [1]. Of approximately 900 species estimated to exist [2] less than a hundred, belonging to *Phlebotomus* and *Lutzomyia* (*sensu* Young and Duncan, 1994 [3]) genera are proven or suspected vectors of human disease in the Old and New Worlds, respectively [4,5]. *Leishmania infantum* is the main causative agent of zoonotic visceral leishmaniasis (VL) and also responsible for cases of cutaneous leishmaniasis (CL) across the Mediterranean sub-region that includes southern Europe, northern Africa and parts of Asia [6,7]. Domestic dogs are primary reservoirs of infection for humans and may suffer from a severe chronic disease (canine leishmaniasis, CanL). The annual incidence of human VL is estimated to range from 1500 to 2700 cases; available figures on CL caused by *L. infantum* are low reliable because of poor reporting [8]. A dozen of *Phlebotomus* species have been implicated in the transmission of Mediterranean *L. infantum*, of which eight have been incriminated as vectors according to conventional criteria [4,9]: *Phlebotomus ariasi* [10], *P. balcanicus* [11], *P. kandelakii* [11], *P. langeroni* [12], *P. neglectus* [13], *P. perfiliewi* [14], *P. perniciosus* [15] and *P. tobbi* [16]. All these species but *P. balcanicus*, which belongs to the subgenus *Adlerius*, are members of the *Larrousius* subgenus.

Effects of long-term climate changes on the geographical expansion of Mediterranean *L. infantum* vectors towards northern latitudes or higher altitudes have been predicted [17] and actually observed in some places, such as in northern Italy [18, 19], French and Spanish Pyrenees [20,21] and in Rhineland-Palatinate, Germany [22]. As a consequence, spread of human and canine disease associated with progressive increase of *Leishmania* seroprevalence rates in dogs were reported at altitudes and latitudes higher than might be expected in several Mediterranean countries [reviewed in [23]]. The activity period of Mediterranean adult sand flies is typically seasonal. Because seasonal phenomena are also very sensitive to variations in temperature, phenological observations may provide high resolution of ongoing climate changes in addition to geographical dispersion parameters [24]. However the available information on sand fly seasonal dynamics in the Mediterranean region is patchy, being disperse in time and space. Although several investigations on this subject were performed over the past 50 years, they included mostly one season—rarely 2 or 3—and were performed in single sites at different periods [e.g. 11, 25–31]. Hence, recent and accurate knowledge of Mediterranean vectors dynamics would be required as a starting baseline for continuing investigations on changes that may have an impact on leishmaniasis transmission. Because investigations of this type are prone to several confounding parameters, prerequisites would be: a) to perform studies in a relatively short period (i.e. a time range of a few years) in order to minimize possible effects of the ongoing slow temperature increase [32]; b) to replicate studies in the same sites for more than one season, with a view to reduce as far as possible the effects of annual climate variations and

local weather events; and c) to carry out studies over a wide geographical area, in order to provide general information from different latitudes and longitudes.

In the frame of EDENext EU FP7 (www.edenext.eu) project, in 2011–2014 a consortium of partners from 8 Mediterranean countries endemic for *L. infantum* have carried out entomological investigations in representative sites for at least 2 consecutive years. In this paper, we report data from about 99000 collected specimens, resulting in the description of seasonal dynamics of about 56000 sand flies belonging to species competent to transmit *L. infantum* over a wide geographical range spanning from Portugal at west to Georgia at east, namely: *P. perniciosus* (Portugal, Spain and Italy); *P. ariasi* (France); *P. neglectus* (Greece); *P. tobbi* (Cyprus and Turkey); *P. balcanicus* and *P. kandelakii* (Georgia).

Materials and Methods

Study areas and vectors

In each country, one or more locations were identified on the basis of the historical presence of proven phlebotomine vector(s) and the evidence of human and/or animal leishmaniasis transmission in the area. Geographical coordinates and altitude of study regions and sites are shown in Table 1. The southernmost site was located in Cyprus (latitude 34°59'54"N) and the northernmost in Languedoc-Roussillon, France (latitude 43°58'23"N). The westernmost site was in Setúbal district, Portugal (longitude 9°16'52"W) and the easternmost in Tbilisi, Georgia (longitude 44°49'30"E). All sites were at low-mid altitudes above sea level: the lowest altitude was in Portugal (3 m), the highest in Spain (691 m). On overview of the collecting sites location in the Mediterranean region is shown in Fig 1.

In Portugal, the Lisbon Metropolitan Region in the centre and the Algarve Region in the south are endemic for VL, CL and CanL, predominantly caused by the *L. infantum* zymodeme MON-1 and transmitted by two vectors, *P. perniciosus* and *P. ariasi* [33,34]. The investigations required collections in multiple sites of the two Regions, because of the known low density of local vectors in most places. Thus, 11 collecting sites from the Setúbal and Lisbon Departments in Lisbon Metropolitan Region were investigated in 2011 and 2012; 11 sites from the Department of Faro in Algarve Region were investigated in 2011, 2012 and 2013.

In Spain, an outbreak of both VL and CL has occurred since mid 2009 in four towns southwest of Madrid, with nearly 600 cases mainly recorded in Fuenlabrada [35]. In contrast to a low prevalence of CanL, lagomorphs—the hare *Lepus granatensis* and the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus*—were identified as unusual reservoir in a large urban park. These animals have been found infected by *L. infantum* at high rates and proved to transmit the parasite to reared *P. perniciosus* [36]. Wild *P. perniciosus*, the only proven vector in the area, was found to harbor the same strain of *L. infantum* causing human and animal infections [37]. Locations bordering the urban center of Fuenlabrada were surveyed in this endemic setting in 2012 and 2013.

In southern France, a traditional endemic focus of human leishmaniasis and CanL caused by *L. infantum* is represented by a hilly area located between the Hérault and Arre valleys in the Languedoc-Roussillon Region. The dominant phlebotomine species in the area is *P. ariasi*, incriminated as *L. infantum* vector in late 1970s [10]. A representative site (Roquedur-le-haut) was investigated in 2011, 2012 and 2013.

In Italy, the central Latium Region is ranked as the third most endemic territory for human VL and CanL, both caused by *L. infantum* MON-1 [38]. *P. perniciosus* is the proven vector in Rome province [29] and this species is found abundant in hills surrounding the capital city. A site from this area (Frascati) was surveyed in 2011 and 2012.

In Greek islands and mainland, leishmaniases have re-emerged during the past three decades [39]. In Crete, both *L. infantum* zymodemes MON-1 and MON-98 were found to

Table 1. Geographical coordinates and elevation of 37 sand fly collecting sites.

Country	Region/District/Site*	No. of sites	Latitude	Longitude	Elevation (m a.s.l.)
Portugal	Lisbon Metropolitan Region/Setúbal and Lisbon	11	From 38°28'37"N to 38°44'51"N	From 9°16'52"W to 8°45'2"W	3–330
	Algarve/Faro	11	From 37°3'27"N to 37°14'20"N	From 8°37'45"W to 7°26'34"W	10–74
Spain	Autonomous Community of Madrid/Fuenlabrada	1	40°17'53"N	3°47'31"W	635–691
France	Languedoc-Roussillon/ Gard/Roquedur-le-haut	1	43°58'23"N	3°39'26"E	603
Italy	Latium/Rome/Frascati	1	41°50'34"N	12°41'57"E	192
Greece	Crete/Heraklion/Fodele	1	35°22'52"N	24°57'29"E	40–70
Cyprus	Paphos/Steni	1	34°59'54" N	32°28'17" E	200
Turkey	Aegean/Aydin/Bascayir	1	37°57'35"N	28°04'03"E	427
	Cukurova/Adana	6	From 37°17'59"N to 37°26'01"N	From 35°31'01"E to 35°39'27"E	150–280
Georgia	Tbilisi/Gldani-Nadzaladevi and Isani-Samgori	3	From 41°42'01"N to 41°44'08"N	From 44°48'59"E to 44°49'30"E	495–603

*Named when only one site was investigated

doi:10.1371/journal.pntd.0004458.t001

cause human VL and CanL. Among 9 *Phlebotomus* species endemic in the island, *P. neglectus*, a proven *L. infantum* vector in Greece [13], is the most abundant and geographically widespread [40]. A representative site (Fodele, Heraklion region) was investigated from 2011 through 2013.

In Cyprus, leishmaniasis has re-emerged in recent years; apparently no human cases caused by *L. infantum* occur in the island, despite this parasite (predominantly zymodeme MON-1) is widespread among dogs [41]. *P. tobbi* is the proven *L. infantum* vector in Cyprus [16], whereas the role of this species in the transmission of the recently introduced *Leishmania donovani* MON-37 (apparently the only cause of human VL and CL in the island [23]) remains to be determined. A representative collection site (Steni, Paphos district) was investigated in 2012 and 2013.

Different entities of human leishmaniasis are endemic in Turkey, including zoonotic VL and CL caused by *L. infantum*, and anthroponotic CL by *L. tropica* [42]. *L. infantum* was



Fig 1. Location of the sand fly collecting sites in the Mediterranean region.

doi:10.1371/journal.pntd.0004458.g001

traditionally prevalent in the Aegean and Mediterranean coasts of western Turkey, however it has been recently detected as an agent of CL in Cukurova region, south Anatolia [43]; genome sequencing of strains isolated from *P. tobbi* and human patients revealed *L. infantum*/*L. donovani* hybrids [44]. Among at least 21 *Phlebotomus* species described in Turkey, a few potential *L. infantum* vectors have been suspected throughout the country, but only *P. tobbi* has been incriminated conclusively [43]. Six collecting sites were selected in villages of the northwest part of the Cukurova region, Adana province, for seasonal dynamics investigations in 2011 and 2012. In western Turkey, a representative site (Bascayr village, Aydin province) endemic for human VL and CanL and showing predominance of the vector *P. tobbi* [45], was selected for investigations on nocturnal activity in 2012.

In Georgia, the disease has emerged as a significant public threat in the capital city of Tbilisi beginning from the years 1990s. The infections, caused by *L. infantum*, were also found widespread in domestic and stray dogs [46]. In this endemic setting, 2 phlebotomine species have been recently incriminated as *L. infantum* vectors, *P. kandelakii* and *P. balcanicus* [11]. Two collecting sites were selected for phenological investigations performed from 2011 through 2013 in each of the two urban districts where VL mostly occurs: Lotkini in Gldani-Nadzaladevi district, and Elia in Isani-Samgori district, respectively. Investigations on nocturnal activity were performed in 2014 in the Vera area of Tbilisi.

Sand fly collection, habitat and species identification

A common protocol for trapping methods and periodicity of sand fly collections was established. Priority was given to the use of CDC miniature light traps equipped with a fine net cage, which were used by all investigators and whose number in each site had to remain unchanged over the years to legitimate comparisons between seasons. One or the other of two common models, considered equivalent for the study purpose (Hausherr's Machine Works, Toms River, New Jersey, USA; John W. Hock Co., Gainesville, Florida, USA) were placed in each collection site for at least 2 consecutive nights per month, with replacement of traps after every night. Most of the teams, however, set light traps for 2 nights or more every 15 days. Previous investigator's experience in each setting showed that trapping yields may vary greatly depending whether sand flies concentrate in hot spots, thus requiring the use of a few traps, or they are dispersed at low density over a territory, which requires a greater sampling effort. Thus, the number of light traps varied from 3 to 15 depending on site, for a total sampling effort ranging from 56 (in 2013 surveys, 6 countries) to 94 traps (in 2012 surveys, 8 countries) per night of capture. They were set operating 1–2 hours before sunset until 1–2 hours after sunrise. For specific investigations on the nocturnal activity of vectors, light traps operated for at least one night in a selected site, and manual or automatic trap replacement was performed every 1 or 2 hours. Temperature and humidity were recorded daily during the trapping period.

Light-attraction collections were complemented by the use of sticky traps in most of the surveyed sites, the choice depending on previous investigator's experience on sand fly yields by both trapping methods. For example, in sites of Cukurova region and Tbilisi interception methods were found to be low productive so that only light traps were employed there. Sticky traps consisted of 20x20 cm white paper coated with castor oil; again, a fixed number of sticky traps per site was set monthly for at least 2 consecutive days.

The start of trapping activity was based on previous local experience. It was established that investigators had to bring collections forward by one month compared to historical observations on the local sand fly appearance. Trapping was stopped when no more sand flies were captured by any method. Because it was considered virtually impossible that teams from different countries could perform simultaneously sand fly trapping exactly at the same annual days,

the common protocol established that, within each month, setting of traps had to be made in a period having day 15 as median. Each team maintained a fixed periodicity of collections in the surveyed territory and, among all teams, catches were actually performed over a maximum range of ± 12 days from the median with a standard deviation of 8 days.

A large variety of domestic and peri-domestic, rarely sylvatic, habitats were surveyed in rural, village or urban areas by means of indoor and/or outdoor collections. In general, they were fairly representative of typical *L. infantum* transmission biotopes in the Mediterranean region. Traps were set in human dwellings, cellars, courtyards, livestock sheds, hen houses, kennels, gardens, shady areas in various types of orchards, olive groves, and vineyards. The large diversity of potential blood meal sources included humans and domestic animals such as dogs, cats, cattle, sheep, goats, horses, rabbits, and poultry. A number of wild mammals of potential interest in *L. infantum* epidemiology were also present in surrounding areas (e.g. black rats, hares, wild rabbits and foxes).

Collected sand flies were preserved in ethanol pending species identification. This was largely performed morphologically using published keys and descriptions [47–52]. Specimen identification of the phlebotomine fauna belonging to taxonomically challenging species (e.g. *P. transcaucasicus*/*P. galilaeus* or *P. sergenti*/*P. similis*) was also confirmed by morphometric measurements [53] and, for some representative specimens, by sequencing analysis of two gene markers, namely cytochrome b [54] and internal transcribed spacer 2 (ITS2) [55]. As regards female members of the *Adlerius* subgenus, for which full taxonomic keys are not available, they were identified with associated males and by differences in pharyngeal armature following Artemiev's drawings [50].

Data analysis and output

The final outcome of this study was the production in practical graphic format of phenological and abundance parameters that may have an impact on *L. infantum* transmission by relevant vector species in each endemic settings and the whole subregion, namely: a) the beginning and the end of adults activity; b) the variation in abundance during the activity period; c) the nocturnal activity. Starting from large databases produced for each site, various data levels were combined *a priori* (e.g. in case of collections performed in multiple sites within a small territory) or in course of data analysis. For example, specimen densities from both sexes were combined in the description of vector population dynamics in single or multiple seasons, whereas only female densities were considered in the evaluation of nocturnal activity. In addition to annual data, the potential behavior of vectors in each endemic setting was evaluated considering combined data from all years of collection. Monthly densities expressed as number of vector specimens/light trap were presented as such in most of the graphs. Correlation analyses were generated by Pearson correlation coefficient; statistics and graph production were performed using GraphPad Prism Software, version 5.00 for Windows (San Diego, California, USA).

Results

Sand fly fauna

A total of 99195 sand fly specimens (59.8% males) were collected from 2011 through 2014, of which 95384 were identified at species level. Species divided by sex and month of collection in each territory are shown in S1–S9 Tables. Specimens presenting problematic identification, mainly *Phlebotomus* (*Larroussious*) females collected in Turkey and Cyprus and morphologically different from the local *L. infantum* vector (*P. tobbi* in both sites), are not included in these tables and have not been considered in further analyses. The sand fly fauna included both

Phlebotomus and *Sergentomyia* genera; cumulatively, males were more abundant than females for most species, sites and years of collection. Furthermore, the male/female ratio was usually higher during the early periods of collection, whereas females outnumbered males in the middle of the warm season.

In sites where a combination of the two trapping methods was used, 56.1% of specimens (27295/48630) was collected by sticky traps (S10 Table). However large variations were recorded depending on sites or sand fly species: for example, yields of *P. perniciosus* in Spain and Portugal were almost identical by both trapping methods, whereas specimens of *P. perniciosus* in Italy, *P. neglectus* in Crete and *P. tobbi* in Cyprus were mostly collected by light traps. On the other hand, *Sergentomyia* specimens were almost exclusively collected by sticky traps (>90% in all sites) confirming low light attractiveness by the members of this genus.

Table 2 summarizes the distribution by country of *Phlebotomus* species identified regardless their relative abundance. From 1 to 3 species were collected in western Mediterranean sites, and from 3 to 9 species in eastern Mediterranean sites. As expected per study design, higher densities were recorded for the proven *L. infantum* vector species in each locality. Where two proven vector species were identified (e.g. *P. perniciosus* and *P. ariasi* in Portuguese and French sites), only the most abundant species was considered in the descriptive seasonal dynamics.

L. infantum vectors: phenology by species and site

The six *L. infantum* vectors marked with an asterisk in Table 2 accounted for a total of 56101 specimens collected from 2011 through 2013 (see S1–S9 Tables for details). Altogether they consisted of 8665 specimens collected in 2011 in six countries (Portugal, France, Italy, Greece, Turkey and Georgia); 28168 specimens collected in 2012 in all eight countries; and 19268 specimens collected in 2013 in six countries (Portugal, Spain, France, Greece, Cyprus and Georgia).

The main parameters for vector phenology, i.e. the period of appearance of adults in collections and the last period in which they were still collected, have been examined separately by target species and sites. Where light traps and sticky traps were used in combination, appearance or disappearance of sand flies in collections was always recorded by both methods. The relationship between the period of appearance/disappearance of vectors and latitude or average annual temperature of sites, was evaluated using data from cumulative years. When used separately in the analysis, latitude and average annual temperature gave very similar results. Fig 2 shows that a highly significant correlation exists between latitude and the first period of sand fly collection ($r^2 = 0.74$; $p < 0.01$). In the two southernmost sites of Cyprus and Crete, specimens of *P. tobbi* and *P. neglectus* were collected as early as the beginning or mid April, respectively; in four territories located at intermediate latitudes, the first specimens of *P. tobbi* (Turkey) and *P. perniciosus* (Spain and Portugal) have been captured in early or mid May, respectively; at more elevated latitudes such as those of the Italian and Georgian sites, *P. perniciosus*, *P. kandelakii* and *P. balcanicus* were collected starting from the first half of June. An exception to this correlation was *P. ariasi* from the northernmost site in France, which was collected since mid May, although only in 2011 and involving a low number of specimens (see S4 Table). When it was collected from different territories, the same vector species appeared earlier at lower latitude, and later at higher latitude: this is the case of *P. tobbi*, which was recorded in the Cypriot site about one month earlier than in Turkish sites, despite the two territories are located at similar altitudes. *P. perniciosus* was collected in different periods of May in Portugal and Spain, and in the first half of June in Italy.

By contrast, a similar analysis performed using the last period of sand fly collection as a variable, showed that the disappearance of adults was not significantly dictated by latitude or average annual temperature: as shown in Fig 3, each species per site appeared to be ending the

Table 2. *Phlebotomus* species collected in selected sites of 8 countries of the Mediterranean region. Exclusive or predominant *Leishmania infantum* vector species are marked with an asterisk.

<i>Phlebotomus</i> species	Portugal	Spain	France	Italy	Greece	Cyprus	Turkey	Georgia
Subgenus <i>Larrousius</i>								
<i>P. ariasi</i>	x		x*					
<i>P. perniciosus</i>	x*	x*	x	x*				
<i>P. neglectus</i>					x*			
<i>P. neglectus/syriacus</i> ^a							x	
<i>P. major</i> s.l. ^a							x	
<i>P. tobbi</i>						x*	x*	
<i>P. galilaeus</i> ^b						x		
<i>P. transcaucasicus</i> ^b							x	
<i>P. kandelakii</i>								x*
<i>P. wenyoni</i>								x
Subgenus <i>Paraphlebotomus</i>								
<i>P. sergenti</i>	x	x				x	x	x
<i>P. similis</i>					x			
<i>P. alexandri</i>							x	
Subgenus <i>Adlerius</i>								
<i>P. balcanicus</i>								x*
<i>P. halepensis</i>								x
<i>P. simici</i>							x	
Subgenus <i>Phlebotomus</i>								
<i>P. papatasi</i>		x			x	x	x	
Subgenus <i>Transphlebotomus</i>								
<i>P. mascittii</i>			x				x	

^a Exhibiting intermediate morphological characters within the *Phlebotomus major* group

^b Both species are also considered subspecies within the *Phlebotomus perfiliewi* group

doi:10.1371/journal.pntd.0004458.t002

activity in a period from mid September (Lisbon) to the second half of November (Crete) without significant correlation with the above parameters ($r^2 = 0.15$; $p = 0.27$).

Seasonal abundance by species and site

The vector abundance varied between species, site and year of collection. Monthly vector densities, expressed as number of specimens/light trap, are shown for each site and year of collection in graphs of Fig 4. Total vector density in a season differed greatly between sites, from the lowest value of 0.3 *P. kandelakii*/light trap/season in Tbilisi in 2011, to the highest value of ~1000 *P. perniciosus*/light trap/season in Fuenlabrada in 2012. Within each site, the target species showed large annual variations in both magnitude and periodicity of density peaks which were partially influenced by local climatic events during the scheduled trapping days, such as strong wind and/or heavy rain. Peaks were rarely recorded in May (e.g. *P. neglectus* in Crete, 2013) or in June (e.g. *P. tobbi* in Turkey, 2011) whereas they were frequently observed from July through September.

Monthly densities pooled from all years of collection, representing a more reliable picture of the potential behavior of vectors in each endemic setting, disclosed roughly four types of trends which were not found necessarily associated to a particular species (Fig 5): 1) A sharp mono-modal trend, with a single peak occurring in July-August (*P. ariasi*, *P. kandelakii* and

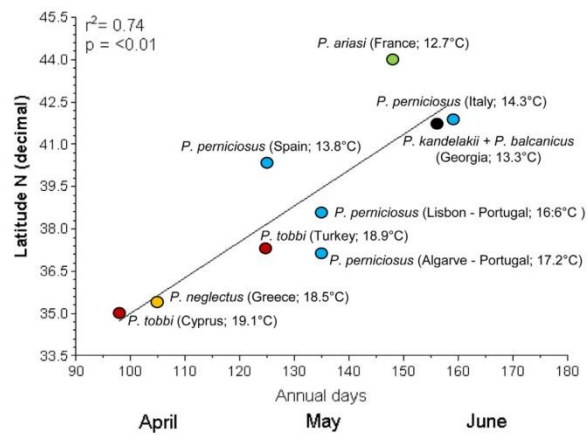


Fig 2. Relationship between latitude of collecting sites and period of appearance of sand flies in collections. Each species is shown by a different color, and the average annual temperature of each site is reported in parenthesis.

doi:10.1371/journal.pntd.0004458.g002

P. balcanicus); 2) A trend much probably resulting from the confluence of 2 peaks of different or similar density encompassing a long period from June through September (*P. perniciosus*); 3) A sharp bi-modal trend, with a first minor peak in May-June and a major peak in August-September (*P. perniciosus*, *P. neglectus* and *P. tobbi*); 4) A tri-modal trend, with peaks increasing in magnitude from May through September (*P. tobbi*).

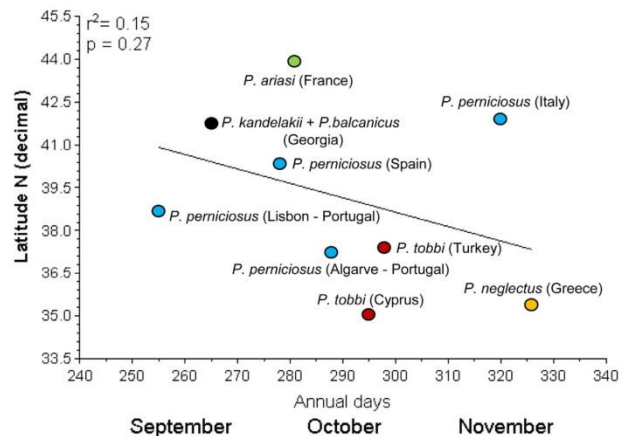


Fig 3. Relationship between the latitude of collecting sites and the last period of positive sand fly collection. Each species is shown by a different color.

doi:10.1371/journal.pntd.0004458.g003

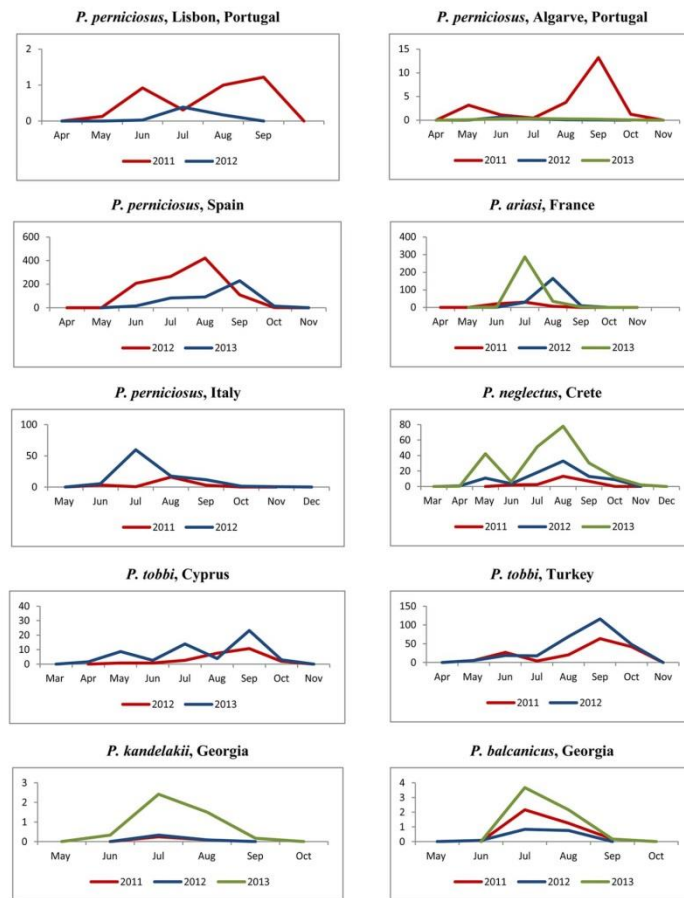


Fig 4. Monthly density of Mediterranean vectors of *Leishmania infantum*, 2011–2013. Density values in Y axis represent the number of specimens of the indicated vector /light trap.

doi:10.1371/journal.pntd.0004458.g004

The relationship between such types of density trend and the latitude or the average annual temperature of sites, was evaluated. When analyzed separately, again latitude and average annual temperature gave very similar results. As shown in Fig 6, a highly significant correlation was detected between latitude decrease and the increase in number of vector density peaks ($r^2 = 0.85$; $p < 0.01$). Interestingly, the trend of *P. tobbi* was tri-modal in the southernmost site of Cyprus, whereas it was bi-modal in Cukurova, Turkey. Analogously, the two distinct peaks observed for *P. perniciosus* in southern Portugal turned to be confluent at higher latitudes in the same country, as with the *P. perniciosus* trend in Spanish and Italian sites. The abundance

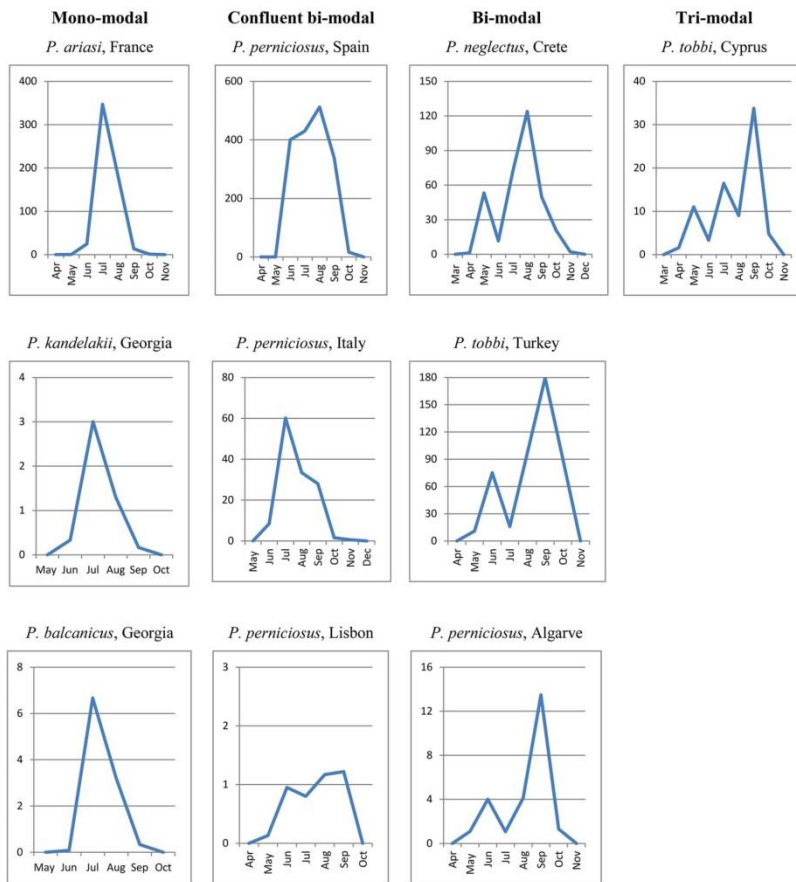


Fig 5. Types of abundance trends recorded in 2011–2013 for Mediterranean vectors of *Leishmania infantum*. Values in Y axis represent vector densities/light trap pooled for the years of trapping in each endemic setting

doi:10.1371/journal.pntd.0004458.g005

patterns of French and Georgian vectors were confirmed to be typically mono-modal as repeatedly shown by historical or more recent surveys [11,56].

To verify if temperatures preceding a vector peak could influence its magnitude, temperature values recorded in relevant months were evaluated against the respective peaks of abundance; temperature/abundance interdependence was then compared between consecutive years in each site. Furthermore, the total number of vector specimens collected in a season was evaluated in respect of the average temperature recorded in the May–October period, their interdependence being also compared between years (S11 Table). We did not detect any meaningful association between temperatures registered at the beginning of the sand fly activity and

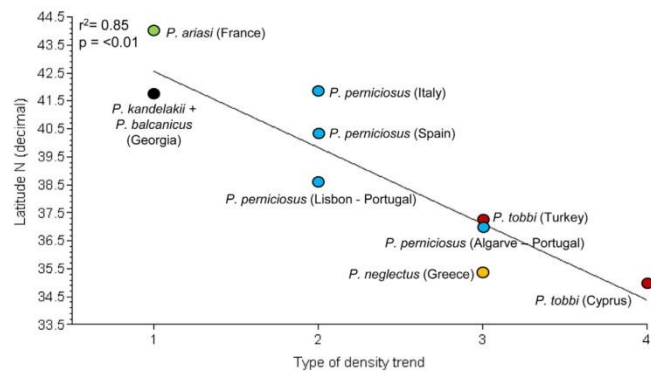


Fig 6. Relationship between latitude of sand fly collecting sites and type of density trend. 1: mono-modal; 2: confluence of two density peaks; 3: bi-modal; 4: tri-modal. Each species is shown by a different color.

doi:10.1371/journal.pntd.0004458.g006

the magnitude of corresponding peaks (it should be noted that no extremely high temperatures were recorded in any site which could justify estivation phenomena). For example, in the Greek site the increase of temperature from May through July was pretty similar in 2012 and 2013, however the *P. neglectus* peak in August 2013 was more than twice August 2012. A similar situation can be seen for *P. tobiasi* in Cyprus in the comparison of 2012 and 2013 seasonal data. In the French site, slightly higher temperatures in May-July 2012 were associated to a *P. ariasi* peak much smaller than a peak occurred after lower temperatures in May-June 2013; the same is more evident for *P. tobiasi* in Cukurova between 2011 and 2012 seasons. Finally, no relationship was detected between average summer temperatures of different years and the respective vector abundances. Sometimes lower temperatures "produced" more specimens in a season than did higher temperatures in the subsequent season (e.g. in Algarve for *P. perniciosus*, in France for *P. ariasi* or in Crete for *P. tobiasi*); other times it was the opposite (e.g. in Italy for *P. perniciosus* or in Cukurova for *P. tobiasi*).

General overview of the seasonal dynamics of Mediterranean *L. infantum* vectors

To answer the European health authorities about the period of potential risk of *L. infantum* transmission in the Mediterranean subregion, this can be inferred by the relative densities of 6 competent vector species from 37 sites over 3 years. To legitimate data pooling from different sites, total monthly catches of any vector were normalized by dividing the number of specimens by the coefficient 'number of light traps x number of nights' (LTxN), these parameters resulting in the overall trapping effort of 5968 LTxN in 2011, 7332 in 2012 and 1848 in 2013 (hence, 14878 LTxN for the whole 2011–2013 period). Exposure to potential infectious bites could thus be associated to a regular bell-shaped density curve having a wide peak center encompassing the July-September period, and falling between early May to late October for more than 99% of values (Fig 7). Apparently, no risk for leishmaniasis transmission took place from December through March in the years considered. This general curve results from the combination of 3 yearly patterns that look very different from each other. Probably because of generalized low yields in 2011 (a total density of 1.5 vectors/ light trap/night) no specimens

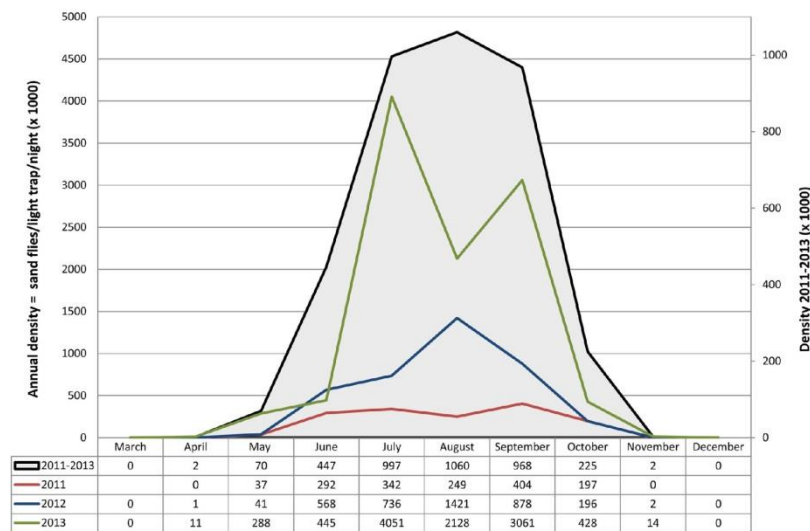


Fig 7. Seasonal density of *Leishmania infantum* vectors recorded in the Mediterranean region in the 2011–2013 period. Densities of 6 vector species pooled from 37 sites are shown separately for each year and for the whole period. For a better presentation of data, density values are multiplied by 1000; annual and 3-year densities are shown on different scale of values.

doi:10.1371/journal.pntd.0004458.g007

were collected in April and November, nor evident density peaks were recorded during the activity period. The 2012 collections resulted in a total density of 3.8 vectors/ light trap/night, distributed in a largely confluent bi-modal trend encompassing the June–September period and having the highest peak in August. By contrast, in 2013 the total density was much higher (10.4 vectors/light trap/night) with a sharp bi-modal trend including two peaks in July and September. Despite these cumulative trends include territories with a wide range of local vector densities, there is evidence that *L. infantum* has been transmitted efficiently to humans and/or dogs in all of them.

Nocturnal activity

Hourly or bi-hourly collections were performed by light traps in one site per country, selected among those investigated for the seasonal dynamics except for a new site in the Aegean region of Turkey (Bascayir, Aydin province) and an additional site in Tbilisi, Georgia. They were typical sites for *P. perniciosus* (Portugal and Italy), *P. ariasi* (France), *P. tobbi* (Aegean and Cukurova regions of Turkey), *P. kandelakii* and *P. balcanicus* (Georgia). Collections were performed once a month from May or June through September or October in 2011 and 2012, respectively, in Cukurova, Turkey; once a month from June through August 2013 in Portugal; 7 days distributed among July and August 2014 in Georgia; 1 day in France in July 2011, and 1 day in Italy and Aegean Turkey in July 2012. Detailed entomological collections from each site are shown in graphs of S1 Fig, which depict a common pattern of nocturnal activity of *L. infantum* vectors. Furthermore, hourly activity were found similar in multiple collections performed in different months in the same site. To complement the above information on the temporal risk of

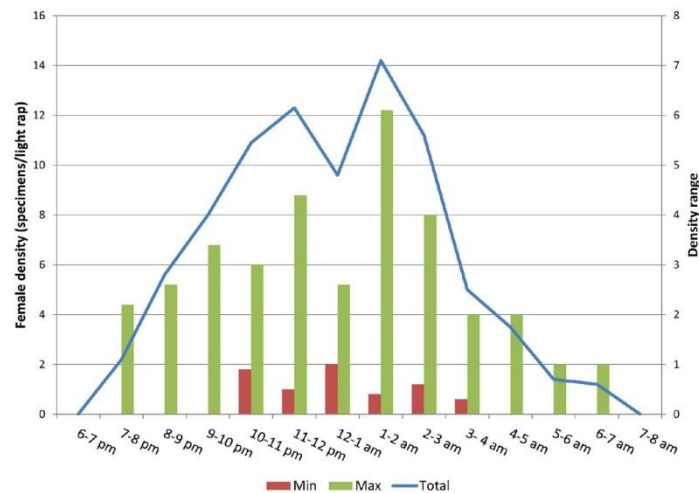


Fig 8. Hourly female density of *Leishmania infantum* vectors in 6 selected Mediterranean sites. Data are presented as female specimens/light trap collected per hour from all sites. Ranges represent the lowest and highest density values among all sites. Cumulative density and range are shown on different scale of values.

doi:10.1371/journal.pntd.0004458.g008

L. infantum transmission in the Mediterranean subregion, a general picture of the nocturnal behavior of females was produced, based on data from 1167 sand flies (40.5% females) collected through a trapping effort of 36 light traps/night. The mean female density/light trap in a night was 13, with a range among sites of 6–22. The hourly density of vectors is shown in Fig 8, which also reports on the density range among sites. Depending on the local vector abundance, females activity started in a range between 7 and 10 pm, and ended in a range between 4 and 7 am, with slight variations among species and sites (for example, the few *P. balcanicus* females collected in Tbilisi ended the activity at 2 am). Peaks of activity (12–14 female density) were found between 11 pm and 2 am, whereas the activity decreased sharply after 3 am.

Discussion

A large retrospective meta-analysis of phenology data sets collected on animals and plants over the past few decades has indicated an advance of spring/summer in Europe [24]. In particular, invertebrates have shown an earlier shift in phenological indicators of about 4 days over 30 years of observations, at latitudes of northern hemisphere that include the Mediterranean basin [57]. Because the global average temperature is projected to rise at a rapid rate [32], it is expected that earlier shifts will increase in magnitude in the near-mid future. As regards Mediterranean phlebotomine sand flies, a retrospective analysis of phenology data sets published over the past 50 years did not result in meaningful conclusions due to the limitations highlighted in the introduction of this paper. Of our investigated sites, much of previous information was left unpublished or the data were relatively recent, such as those from Georgia [11] or eastern Turkey sites [58]. As expected, in these sites the main parameters of seasonal dynamics were found unchanged. In the French location of Roquedur-le-haut, no phenological

variations have occurred since the collections performed in 1977 by Rioux et al. [59] as compared to our 2011 trapping: in both years, the emergence of adults was recorded on May. Hence, our data from several georeferenced sites may represent a robust starting point for continuing surveillance on sand fly dynamics that may impact on leishmaniasis transmission in the near future. Among basic entomological parameters, the unequivocal identification of species and their ascertained role as leishmaniasis vectors is important. Therefore species so far unproven to transmit *L. infantum* were excluded from our analyses.

Our findings confirm historical observations that temperature—whose magnitude is negatively correlated with latitude—is a major determinant for the activity start of leishmaniasis vectors. It is well established that during cold months sand flies undergo diapause as fourth larval stage (L4). In laboratory-reared species, at low temperature conditions a diapause period may run even 9 months, and only after the temperature is raised to a certain level L4 larvae pupate and adults emerge within two or three weeks [60]. Thus, in our Mediterranean sites the periods of pupation and adults emergence were much probably dependent on generalized temperature increase to which L4 larvae were exposed in their natural environment, approximately in March, April or May in sites where adults were firstly collected in April, May or June, respectively. The emergence of some vectors (*P. tobbi* and *P. neglectus*) as early as April in southern Mediterranean latitudes (around 35° N) is not surprising, as *P. perniciosus* was found the behave in the same way at similar latitudes (around 37° N, e.g. in Tunis [61], Almeria [28] and Catania [31]).

On the other hand, we have shown that the end of adults activity may occur at different months, from September through November, independently from latitude, average annual temperature, or temperatures recorded in the sites during the activity season. Several investigations on Mediterranean *L. infantum* vectors reported on such time interval for the last sand fly-positive collections; very recently, specimens of *P. perniciosus* were collected in Catania even in early December [31]. A careful analysis of literature with particular regard to the latitude of collecting sites suggests that our findings are well supported, as no apparent association could be detected between this parameter and the disappearance of adults in collections. It suggests that for this stage of life cycle the dependence on average annual temperature is less pronounced. Laboratory observations have shown that adults are not much sensitive to temperature changes as they are larval stages: lower temperatures slow down sand fly metabolism and increase survival time especially of blood-fed females; periods of developmental phases become longer as regards defecation, oviposition and eggs hatch [62]. These processes may be variable from one site to the other, and may depend on the initial larval/adult population size, local environmental variables and on less investigated parameters interfaced with temperature such as endogenous clocks sensitive to photoperiod [63,64].

Vector densities varied greatly between different sites, and in most of them seasonal and monthly density patterns were also very different between years. A recent analysis of historical *P. ariasi* data has confirmed that large differences in abundance can be found between close collecting stations within the same territory, without appreciable relationship with major phytoecological variables [56]. Local weather events limited in time, such as strong wind and/or heavy rain, were found to affect the productivity of adults in our scheduled periods of collection; this fact could have offered a biased picture of the potential phlebotomine behaviour in case the investigations were performed during a single season only. In the search for causes underlying variations in annual density patterns, we could not detect any association between temperatures recorded during the collection period and the concomitant occurrence/magnitude of density peaks or the total vector abundance. This would suggest, rather, that winter (or, in general, the whole annual mean temperature) may affect the relative density of adults emerging in the subsequent spring/summer, most probably having an impact on the survival

rate of overwintering larval populations. Actually, the occurrence of multiple density peaks was significantly correlated with sites located at lower latitudes and having higher annual temperatures. The earlier peaks, representing the first emerging adult generation, have always been smaller than the subsequent peak(s), which may indicate a sequence of summer generations with increasing abundance. The occurrence of mono-modal peaks was repeatedly confirmed in French *P. ariasi* and in Georgian vectors [11, 56]. In contrast, different patterns of density have been reported for *P. perniciosus* from different sites, or from the same site in different years. A sharp bi-modal trend of this species, peaking in July and September, was consistently found over the years in Mediterranean sites located at low latitudes, such as Tunis [61], Almeria [28], Algarve area [65] and Catania [31]. In intermediate or higher latitudes, instead, single large peaks or two partially confluent peaks of *P. perniciosus* encompassing the June/July–September period, have been recorded (e.g. Torres Novas, central Portugal [66]; Régua, north Portugal [67]; Madrid province, central Spain [68]; and Putignano, Italy [69]). It should be noted, however, that at these latitudes there are examples of variable *P. perniciosus* density patterns recorded in different years from the same sites. In two consecutive years, a wide mono-modal trend and two partially overlapping peaks, respectively, were reported in Rome province [29]; analogously, a large mono-modal and a sharp bi-modal trend were shown in Marseille area after 2 years, respectively [70]. Hence, in sites located at intermediate and higher latitudes the potential behavior of *P. perniciosus* can be better depicted from multi-seasonal data as having a wide confluent pattern of density, which can be subject to annual variations within its range. Finally, for the first time a tri-modal peak was observed in a *L. infantum* vector (*P. tobbi*, Cyprus). After emergence of this species in April, density peaks have been recorded in May, July and September, which is compatible with a series of 2 summer generations.

The nocturnal activity of phlebotomine vectors is generated by the circadian clock that coordinates feeding activities important for the dynamics of *Leishmania* transmission [63]. While we do not expect that the circadian rhythm will be much influenced by the rise in global average temperature, we consider our findings as a useful complement to evaluate and predict leishmaniasis risk associated with sand fly activity and abundance. We recorded a common pattern of vector females activity that, at least in places with higher vector abundance, increased shortly after sunset and continued until just after sunrise. However the main period of activity was found between 11 pm and 2 am for all vector species, which is an important information for the evaluation of exposure risk to *L. infantum*. The female population was collected by light traps, so that it included specimens with different activity behaviors such as sugar feeding, host seeking, blood feeding, mating, and oviposition. We did not determine the parous rate of females, which could be important to evaluate the behavior of potentially *Leishmania*-infected flies. Recently, it was shown that parous and nulliparous females of *P. orientalis* (a member of the *Larroussius* subgenus) exhibit different periodicity of nocturnal abundance [71].

In conclusions, we found that cumulative collections performed over consecutive years can provide homogeneous patterns of the potential behavior of leishmaniasis vectors in selected sites, which we propose may represent sentinel areas for future monitoring.

Considering both, the relative adults densities and the low probability of females harboring parasite infections in earliest periods of activity, the highest potential risk for *L. infantum* transmission in the Mediterranean subregion may be identified during the months from June through October (97% relative vector density) in the investigated period. We can also conclude that such risk was not equally distributed throughout the region, since earlier emergence and density waves of sand flies were more frequent in southern territories.

Supporting Information

S1 Fig. Hourly or bi-hourly CDC-light trap collection of *L. infantum* vector specimens in 6 selected Mediterranean sites.

(TIF)

S1 Table. Phlebotomine sand fly species collected in 11 sites of the Lisbon Metropolitan region, Portugal.

(DOCX)

S2 Table. Phlebotomine sand fly species collected in 11 sites of the Algarve region, Portugal.

(DOCX)

S3 Table. Phlebotomine sand fly species collected in Fuenlabrada, Spain.

(DOCX)

S4 Table. Phlebotomine sand fly species collected in Roquedur-le-haut, France.

(DOCX)

S5 Table. Phlebotomine sand fly species collected in Frascati, Italy.

(DOCX)

S6 Table. Phlebotomine sand fly species collected in Fodele, Crete, Greece.

(DOCX)

S7 Table. Phlebotomine sand fly species collected in Steni, Cyprus.

(DOCX)

S8 Table. Phlebotomine sand fly species collected in 6 sites of Cukurova region, Turkey.

(DOCX)

S9 Table. Phlebotomine sand fly species collected in 2 sites of Tbilisi, Georgia.

(DOCX)

S10 Table. Results of phlebotomine sand fly collections in sites where miniature CDC light trapping (CDC) was regularly associated with sticky paper trapping (ST).

(DOCX)

S11 Table. Comparison of temperatures and vector abundances recorded in each site between different years. Examples are given of the interdependency between i) average monthly temperatures registered at the beginning of the sand fly activity and magnitude of peaks; and ii) average summer temperatures and total vector abundance.

(PDF)

Acknowledgments

Our colleague Eka deceased on September 13, 2015. We would like to dedicate this paper to her memory.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BA CM LC MJ RM ALB DS MA YO EGo MG PV LG. Performed the experiments: BA CM MOA LC MJ EGo RM ALB JP BV CT CC NR MT DS GB RB CK NTsi ED MA VC AM MK YO SKA OEK FG GO SK NTse LT EG MG LG. Analyzed the data: BA GB PV LG. Wrote the paper: LG BA PV.

References

- Killick-Kendrick R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* 1999; 17: 279–289 PMID: [10384867](#)
- Ready PD. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol* 2013; 58: 227–250 doi: [10.1146/annurev-ento-120811-153557](#) PMID: [23317043](#)
- Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Am Entomol Inst* 1994; 54: 1–881.
- World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, 22–26 March 2010. Geneva: WHO Technical Report Series 949
- Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol* 2013; 27: 123–147 doi: [10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x](#) PMID: [22924419](#)
- Pratlong F, Lami P, Ravel C, Balard Y, Dereure J, Serres G, et al. Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. *Parasitology* 2013; 140: 423–434 doi: [10.1017/S0031182012001825](#) PMID: [23146283](#)
- Gouzelou E, Haralambous C, Antoniou M, Christodoulou V, Martinković F, Živičnjak T, et al. Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. *Parasit Vectors* 2013; 6:342 doi: [10.1186/1756-3305-6-342](#) PMID: [24308691](#)
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012; 7: e35671 doi: [10.1371/journal.pone.0035671](#) PMID: [22693548](#)
- Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol* 1990; 4: 1–24 PMID: [2132963](#)
- Rioux JA, Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Young CJ, Turner DP, Lanotte G, et al. [Ecology of leishmaniasis in the south of France. 11. Canine leishmaniasis: successful experimental transmission from dog to dog by the bite of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921]. *Ann Parasitol Hum Comp* 1979; 54: 401–407. French PMID: [533108](#)
- Giorgobiani E, Lawyer PG, Babuadze G, Dolidze N, Jochim RC, Tskhvaradze L, et al. Incrimination of *Phlebotomus kandelakii* and *Phlebotomus balcanicus* as vectors of *Leishmania infantum* in Tbilisi, Georgia. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1609 doi: [10.1371/journal.pntd.0001609](#) PMID: [22509422](#)
- Doha S, Shehata MG. *Leishmania infantum* MON-98 isolated from naturally infected *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae) in El Agamy, Egypt. *J Med Entomol* 1992; 29: 891–893 PMID: [1404272](#)
- Léger N, Gramiccia M, Gradoni L, Madulo-Leblond G, Pesson B, Ferté H, et al. Isolation and typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus neglectus* on the island of Corfu, Greece. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 419–420 PMID: [3232178](#)
- Maroli M, Gramiccia M, Gradoni L. Natural infection of *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 8: 596–598
- Bettini S, Gramiccia M, Gradoni L, Atzeni MC. Leishmaniasis in Sardinia: II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, in the province of Cagliari. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80: 458–9 PMID: [3798544](#)
- Léger N, Depaquit J, Ferté H, Rioux JA, Gantier JC, Gramiccia M, et al. [Phlebotomine sandflies (Diptera-Psychodidae) of the isle of Cyprus. II-Isolation and typing of *Leishmania* (*Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (zymodeme MON 1) from *Phlebotomus* (*Larrousius*) *tobbi* Adler and Theodor, 1930]. *Parasite* 2000; 7: 143–146. French
- Fischer D, Moeller P, Thomas SM, Naucke TJ, Beierkuhnlein C. Combining climatic projections and dispersal ability: a method for estimating the responses of sandfly vector species to climate change. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1407 doi: [10.1371/journal.pntd.0001407](#) PMID: [22140590](#)
- Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, et al. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health* 2008; 13: 256–264 doi: [10.1111/j.1365-3156.2007.01998.x](#) PMID: [18304273](#)
- Morosetti G, Bongiorno G, Beran B, Scalone A, Moser J, Gramiccia M, et al. Risk assessment for canine leishmaniasis spreading in the north of Italy. *Geospat Health* 2009; 4: 115–127 PMID: [19908194](#)

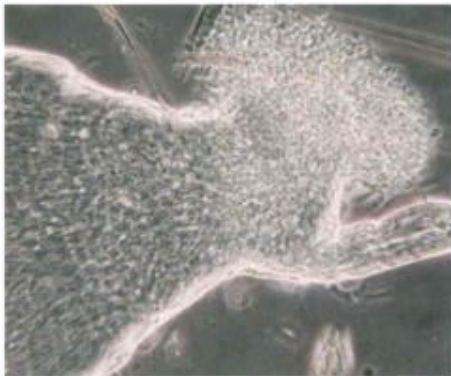
20. Dereure J, Vanwambeke SO, Malé P, Martínez S, Pratlong F, Balard Y, et al. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009; 9: 687–694 doi: [10.1089/vbz.2008.0126](#) PMID: [19271999](#)
21. Ballart C, Barón S, Alcover MM, Portús M, Gállego M. Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Andorra: first finding of *P. perniciosus* and wide distribution of *P. ariasi*. *Acta Trop* 2012; 122: 155–159 PMID: [22154881](#)
22. Naucke TJ, Menn B, Massberg D, Lorentz S. Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res* 2008; 103: S65–68 doi: [10.1007/s00436-008-1052-y](#) PMID: [19030887](#)
23. Antoniou M, Gramiccia M, Molina R, Dvorak V, Volt P. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro Surveill* 2013 25; 18: 20540 PMID: [23929183](#)
24. Menzel A, Sparks TH, Estrella N, Koch E, Aasa A, Ahas R et al. European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Glob Chang Biol* 2006; 12: 1969–1976
25. Rioux JA, Golvan YJ, Croset H, Houin R, Juminer B, Bain O, et al. [Ecology of leishmaniasis in Southern France. 1. *Phlebotomus*. Sampling-ethology]. *Ann Parasitol Hum Comp* 1967; 42: 561–603. French PMID: [5630232](#)
26. Maroli M, Bettini S. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): (I) An investigation on phlebotomine sandflies in Grosseto Province. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977; 71: 315–321 PMID: [595080](#)
27. Pesson B, Leger N, Madulo-Leblond G. [Leishmaniasis in Greece: the sandflies of the Ionian islands and Aegean Sea]. *Ann Parasitol Hum Comp* 1984; 59: 277–295. French PMID: [6465795](#)
28. Morillas Márquez F, Sanchis Marín MC, Martín Sánchez J, Acedo Sánchez C. On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the Province of Almería in southeastern Spain. *Parassitologia* 1991; 33: 437–444 PMID: [1841241](#)
29. Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, et al. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop* 2008; 105: 158–165 PMID: [18035329](#)
30. Maia C, Afonso MO, Neto L, Dionísio L, Campino L. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. *J Vector Borne Dis* 2009; 46: 268–272 PMID: [19959852](#)
31. Lisi O, D'Urso V, Vaccalluzzo V, Bongiorno G, Khoury C, Severini F, et al. Persistence of phlebotomine *Leishmania* vectors in urban sites of Catania (Sicily, Italy). *Parasit Vectors* 2014; 9:560
32. IPCC—Intergovernmental Panel on Climate Change. *Climate Change 2014—Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part B: Regional Aspects*. New York: Cambridge Press; 2014
33. Pires CA. [Phlebotomus of Portugal. I-Natural infestation of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 and *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania* in the zoonotic focus of Arrábida (Portugal)]. *Ann Parasitol Hum Comp* 1984; 59: 521–524. French PMID: [6508146](#)
34. Campino L, Pratlong F, Abranches P, Rioux JA, Santos-Gomes G, Alves-Pires C, et al. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop Med Int Health* 2006; 11: 1708–1714 PMID: [17054751](#)
35. Arce A, Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, García N, Moratilla L, et al. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill* 2013 25; 18: 20546 PMID: [23929177](#)
36. Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S, Molina R. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet Parasitol* 2014 28; 202: 296–300 PMID: [24774435](#)
37. Domínguez-Bernal G, Jiménez M, Molina R, Ordóñez-Gutiérrez L, Martínez-Rodrigo A, Mas A, et al. Characterisation of the ex vivo virulence of *Leishmania infantum* isolates from *Phlebotomus perniciosus* from an outbreak of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasit Vectors* 2014; 7: 499 doi: [10.1186/s13071-014-0499-1](#) PMID: [25376381](#)
38. Gramiccia M, Scalone A, Di Muccio T, Orsini S, Fiorentino E, Gradoni L. The burden of visceral leishmaniasis in Italy from 1982 to 2012: a retrospective analysis of the multi-annual epidemic that occurred from 1989 to 2009. *Euro Surveill* 2013; 18: 20535 PMID: [23929120](#)
39. Ntais P, Sifaki-Pistola D, Christodoulou V, Messaritakis I, Pratlong F, Poupalos G, et al. Leishmaniasis in Greece. *Am J Trop Med Hyg* 2013; 89: 906–915 doi: [10.4269/ajtmh.13-0070](#) PMID: [24062479](#)
40. Christodoulou V, Antoniou M, Ntais P, Messaritakis I, Ivovic V, Dedet JP, et al. Re-emergence of visceral and cutaneous leishmaniasis in the Greek Island of Crete. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12: 214–222 doi: [10.1089/vbz.2011.0004](#) PMID: [22217163](#)

41. Mazeris A, Soteriadou K, Dedet JP, Haralambous C, Tsatsaris A, Moschandreas J, et al. Leishmaniasis and the Cyprus paradox. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82: 441–448 doi: [10.4269/ajtmh.2010.09-0282](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0282) PMID: [20207870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20207870/)
42. Ozensoy Toz S, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarli AT, et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. *PLoS Negl Trop Dis* 2013 9; 7: e2205 doi: [10.1371/journal.pntd.0002205](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002205) PMID: [23675543](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23675543/)
43. Svobodová M, Alten B, Zídková L, Dvůrák V, Hlaváčková J, Mysková J, et al. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *Int J Parasitol* 2009; 39: 251–256 doi: [10.1016/j.ijpara.2008.06.016](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.016) PMID: [18761342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18761342/)
44. Rogers MB, Downing T, Smith BA, Imamura H, Sanders M, Svobodova M, et al. Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated *Leishmania* population. *PLoS Genet* 2014; 10: e1004092 doi: [10.1371/journal.pgen.1004092](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004092) PMID: [24453988](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24453988/)
45. Ozbek Y, Balcioglu IC, Olgen MK, Simsek FM, Ozensoy Toz S, Ertabaklar H, et al. Spatial distribution of phlebotomine sand flies in the Aydin Mountains and surroundings: the main focus of cutaneous leishmaniasis in western Turkey. *J Vector Ecol* 2011; 36: S99–S105 doi: [10.1111/j.1948-7134.2011.00118.x](https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00118.x) PMID: [21366787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21366787/)
46. Giorgobiani E, Chitadze N, Chanturia G, Grdzeldze M, Jochim RC, Machabishvili A, et al. Epidemiologic aspects of an emerging focus of visceral leishmaniasis in Tbilisi, Georgia. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1415 doi: [10.1371/journal.pntd.0001415](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001415) PMID: [22180796](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22180796/)
47. Theodor O. Psychodidae—Phlebotomine. In: Lindner E, editor. *Die Fliegen der Palaearktischen Region*, 9c. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung; 1958. pp. 1–55
48. Perfil'ev PP. [Phlebotominae]. Jerusalem: Israel Program of Scientific Translations; 1968. Russian
49. Lewis DJ. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull Br Mus Nat Hist Entomol* 1982; 45: 121–209
50. Artemiev MM. A revision of the sandflies of the subgenus *Adlerius* (Diptera, Psychodidae, Phlebotomus). *Zool Zh* 1980; 59: 1177–1193
51. Leger N, Pesson B, Madulo-Leblond G, Abonnenc E. Sur la différenciation des femelles du sous-genre *Larrousius* Nitzulescu, 1931 (Diptera-Phlebotomidae) de la région méditerranéenne. *Ann Parasitol Hum Comp* 1983; 58: 611–623 PMID: [6673646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6673646/)
52. Killick-Kendrick R, Tang Y, Killick-Kendrick M, Sang DK, Sirdar MK, Ke L, et al. The identification of female sandflies of the subgenus *Larrousius* by the morphology of the spermathecal ducts. *Parassitologia* 1991; 33: 335–347 PMID: [1841225](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1841225/)
53. Depaquit J, Bounamous A, Akhouni M, Augot D, Sauvage F, Dvorak V, et al. A taxonomic study of *Phlebotomus* (Larrousius) perfilewii s. l. *Infect Genet Evol* 2013; 20: 500–508 PMID: [24140558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24140558/)
54. Essegir S, Ready PD, Killick-Kendrick R, Ben-Ismaïl R. Mitochondrial haplotypes and geographical vicariance of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Mol Biol* 1997; 6: 211–225 PMID: [9272439](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9272439/)
55. Depaquit J, Ferté H, Léger N, Lefranc F, Alves-Pires C, Hanafi H, et al. ITS 2 sequences heterogeneity in *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus similis* (Diptera, Psychodidae): possible consequences in their ability to transmit *Leishmania tropica*. *Int J Parasitol* 2002; 32: 1123–1131 PMID: [12117495](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12117495/)
56. Rioux JA, Carron S, Dereure J, Périères J, Zeraia L, Franquet E, et al. Ecology of leishmaniasis in the South of France. 22. Reliability and representativeness of 12 *Phlebotomus ariasi*, *P. perniciosus* and *Sergentomyia minuta* (Diptera: Psychodidae) sampling stations in Vallespir (eastern French Pyrenees region). *Parasite* 2013; 20: 34 doi: [10.1051/parasite/2013035](https://doi.org/10.1051/parasite/2013035) PMID: [24112589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24112589/)
57. Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* 2003 2; 421: 57–60 PMID: [12511952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12511952/)
58. Belen A, Bulent A. Seasonal dynamics and altitudinal distributions of sand fly (Diptera: Psychodidae) populations in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Cukurova region of Turkey. *J Vect Ecol* 2011; 36 (Suppl 1): S87–S94
59. Rioux JA, Killick-Kendrick R, Périères J, Turner DP, Lanotte G. Écologie des leishmanioses dans le Sud de la France. 13. Les sites de « flanc de coteau », biotopes de transmission privilégiés de la leishmaniose viscérale en Cévennes. *Ann Parasitol Hum Comp* 1980; 55: 445–453. French PMID: [7458169](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7458169/)
60. Volf P, Volfova V. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J Vector Ecol* 2011; 36: S1–9 doi: [10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x](https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x) PMID: [21366760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21366760/)
61. Croset H, Rioux JA, Juminer B, Tour S. Fluctuations annuelles des populations de *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, *Phlebotomus perfilewii* Parrot, 1930 et *Sergentomyia minuta* parroti (Adler et

- Theodor, 1927) [Diptera: Psychodidae] en Tunisie du Nord. Arch Inst Pasteur Tunis 1970; 47, 43–56. French
62. Benkova I, Volf P. Effect of temperature on metabolism of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 2007; 44: 150–154 PMID: [17294933](#)
63. Meireles-Filho AC, Kyriacou CP. Circadian rhythms in insect disease vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013; 108: 48–58
64. Rivas GB, de Souza NA, Peixoto AA, Bruno RV. Effects of temperature and photoperiod on daily activity rhythms of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Parasit Vectors 2014 19; 7: 278 doi: [10.1186/1756-3305-7-278](#) PMID: [24947114](#)
65. Maia C, Afonso MO, Neto L, Dionísio L, Campino L. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. J Vector Borne Dis 2009; 46, 268–272 PMID: [19959852](#)
66. Branco S, Alves-Pires C, Maia C, Cortes S, Cristovão JM, Gonçalves L, et al. Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal. Acta Trop 2013; 125, 339–348 doi: [10.1016/j.actatropica.2012.12.008](#) PMID: [23262215](#)
67. Alves Pires C, Ribeiro H. The phlebotomine sandflies of Portugal. V- Observations on the ecology of the vectors of leishmaniasis in the Alto Douro region. Parassitologia 1991; 33 (S1): 63–68
68. Gálvez R, Descalzo MA, Miró G, Jiménez MI, Martín O, Dos Santos-Brandao F, et al. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. Acta Trop 2010; 115, 95–102 doi: [10.1016/j.actatropica.2010.02.009](#) PMID: [20171154](#)
69. Tarallo VD, Dantas-Torres F, Lia RP, Otranto D. Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy. Acta Trop 2010; 116, 227–234 doi: [10.1016/j.actatropica.2010.08.013](#) PMID: [20816927](#)
70. Cotteaux-Lautard C, Leparc-Goffart I, Berenger JM, Plumet S, Pages F. Phenology and host preferences *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Phlebotominae) in a focus of Toscana virus (TOSV) in South of France. Acta Trop 2016; 153, 64–69 PMID: [26477847](#)
71. Gebresilassie A, Kirstein OD, Yared S, Akilu E, Moncaz A, Tekie H, Balkew M, Warburg A, Hailu A, Gebre-Michael T. Nocturnal periodicity of *Phlebotomus* (Larroussius) *orientalis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Northern Ethiopia. Parasit Vectors 2015; 8: 186 doi: [10.1186/s13071-015-0804-7](#) PMID: [25889314](#)

METHODS IN SAND FLY RESEARCH

Ricardo Molina
Maribel Jiménez
Jorge Alvar



AUTHORS

Ricardo Molina

Laboratory of Medical Entomology National Centre
for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III,
Majadahonda, Madrid, Spain

Maribel Jiménez

Laboratory of Medical Entomology National Centre
for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III,
Majadahonda, Madrid, Spain

Jorge Alvar

Leishmaniasis Program Drugs for Neglected Diseases initiative
Geneva, Switzerland

CO-AUTHORS

Estela González

Laboratory of Medical Entomology National Centre
for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III,
Majadahonda, Madrid, Spain

Sonia Hernández-Taberna

Laboratory of Medical Entomology, Instituto de Salud Carlos III,
Majadahonda, Madrid, Spain

Inés Martín-Martín

Laboratory of Medical Entomology National Centre for Microbiology,
Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain.
Present address: Laboratory of Malaria and Vector Research
National Institute of Allergy and Infectious Diseases National
Institutes of Health Rockville, Maryland, USA

BROTE DE
LEISHMANIASIS
EN FUENLABRADA Y OTROS MUNICIPIOS
DE LA
COMUNIDAD DE MADRID

EL PAPEL DE LAS LIEBRES Y LOS CONEJOS
COMO RESERVORIOS



COLEGIO OFICIAL
DE VETERINARIOS
DE MADRID



Comunidad
de Madrid

DINÁMICA ESTACIONAL, PREFERENCIAS ALIMENTARIAS Y NIVELES DE INFECCIÓN POR *LEISHMANIA INFANTUM* EN *PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS* CAPTURADOS EN BOSQUE SUR (2012-2013)

Maribel Jiménez, Estela González, Sonia Hernández, Inés Martín-Martín y Ricardo Molina

Unidad de Entomología Médica. Servicio de Parasitología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid.

Resumen

Durante el periodo de actividad de los flebotomos - mayo a octubre - de 2012 y 2013 se realizaron estudios entomológicos en cuatro estaciones de muestreo situadas en Bosque Sur, colindantes al área urbana. Cada mes, durante dos días consecutivos, se colocaron en cada estación de muestreo 20 trampas adhesivas (20 x 20 cm) y 2 trampas de luz tipo CDC. El objetivo del trabajo fue conocer la fenología de *Phlebotomus perniciosus* en el foco de leishmaniasis y estudiar su relación con los niveles de infección por *Leishmania infantum* en las hembras capturadas. Además, se estudió la fuente de la sangre ingerida por las hembras, así como la presencia de ADN de *L. infantum* mediante técnicas moleculares. En los dos años de estudio se capturaron un total de 29.729 flebotomos, 12.271 flebotomos con trampas CDC y 17.458 con trampas adhesivas. La identificación taxonómica sitúa a *P. perniciosus* como la especie mayoritaria en el foco, con un promedio de densidad de 159,01/m² en 2012 y de 146,13/m² en 2013. La disección de un total de 736 hembras en 2012 y de 864 en 2013 dio como resultado la presencia de hembras infectadas por *L. infantum* en todas las estaciones. El estudio de las preferencias alimentarias, mediante amplificación de un fragmento de un tamaño de 359 pb del gen citocromo b y posterior secuenciación, ha permitido identificar a la liebre y al conejo como las principales fuentes de alimentación de los flebo-

tomos. Estos datos aportan una importante información epidemiológica en relación a la transmisión de *L. infantum* en el foco.

Introducción

El estudio de los vectores implicados en los focos de leishmaniasis es fundamental para un mejor conocimiento del papel que juegan en la transmisión de *Leishmania* y el desarrollo y ejecución de programas de control eficientes¹. En la Comunidad de Madrid se ha podido demostrar que solo dos especies de flebotomos, de las siete descritas en esta región - *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 y *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 - pueden ser vectores de *Leishmania infantum*, siendo *P. perniciosus* su principal vector^{2,3}.

En un estudio piloto realizado en 2011, a lo largo del periodo de actividad teórica de los flebotomos, de mayo a octubre, se colocaron trampas adhesivas en diferentes estaciones de muestreo del municipio de Fuenlabrada, apareciendo *P. perniciosus* como el único vector potencial en la zona objeto de estudio, situándose en 45,3 flebotomos/m² la densidad para esta especie⁴. La presencia de *L. infantum* en un número importante de las hembras capturadas (58,5%), así como la presencia de sangre de liebre en los tubos digestivos de 6 de las 14 hembras analizadas, aportaron una información relevante⁵. A partir de estos datos preliminares, se

XENODIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIOSIS: IMPLICACIÓN DE LOS LEPÓRIDOS EN EL CICLO SELVÁTICO DE *LEISHMANIA INFANTUM* EN BOSQUE SUR

Ricardo Molina, Estela González, Inés Martín-Martín, Sonia Hernández y Maribel Jiménez

Unidad de Entomología Médica. Servicio de Parasitología. Centro Nacional de Microbiología.
Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid.

Resumen

Se realizaron estudios de xenodiagnóstico en 7 liebres y 10 conejos silvestres, seropositivos frente a *Leishmania infantum* y aparentemente sanos, que habían sido capturados en la zona del brote de leishmaniasis humana del suroeste de la Comunidad de Madrid. Ambos leporidos fueron capaces de infectar a *Phlebotomus perniciosus*, el vector competente en la zona del brote, aunque en diferente proporción: en liebres, la tasa de infección alcanzó en promedio valores del 5,1%, mientras que en conejos fue de 0,94%. Por tanto, estos estudios han confirmado que ambos leporidos estarían jugando un papel destacado, aunque en diferente grado, como reservorios activos del parásito en el brote. También ponen de manifiesto la existencia de un ciclo de transmisión silvestre, independiente del doméstico convencional, vinculado a la periferia urbana.

Introducción

El xenodiagnóstico es una metodología que permite probar la presencia de un parásito u otro patógeno en un vertebrado utilizando para tal fin un animal de otra especie, generalmente, el vector invertebrado de la enfermedad. De este modo el agente patógeno podrá ser identificado con más facilidad, sobre todo si dejamos transcurrir el periodo de incubación suficiente que permita su multiplicación un número indeterminado de veces dentro del vector. De hecho, podría ser definido como una au-

téntica "PCR biológica". Resulta especialmente útil cuando la concentración del parásito en el hospedador vertebrado a estudiar es tan baja que no permite un diagnóstico microscópico directo. Se trata de un método parasitológico clásico utilizado por primera vez en Brasil por Brumpt¹ en 1914 para identificar la infección por *Trypanosoma cruzi* en una serpiente de agua (*Helicops modestus*). El xenodiagnóstico se ha utilizado durante décadas para el aislamiento y/o identificación de *Trypanosoma cruzi* en individuos infectados, por ser, además, un método económico para diagnosticar la infección por este parásito. Hoy en día, es una herramienta utilizada también para aislar y/o identificar *Borrelia* sp., usando garrapatas; arbovirus, usando culicidos y otros dípteros hematófagos o *Leishmania* sp., usando flebotominos². El xenodiagnóstico de la leishmaniasis causada por *Leishmania infantum* se ha utilizado en nuestro entorno con diferentes propósitos, tanto en la leishmaniasis humana como canina. Ha servido para demostrar en el perro que los animales asintomáticos pueden ser tan infectivos como los sintomáticos^{3,4}. Es muy útil también en el seguimiento parasitológico-entomológico de los perros tratados frente a esta enfermedad⁷⁻¹⁰. En el ser humano el xenodiagnóstico se ha empleado tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunodeprimidos, especialmente en estos últimos, antes y después del tratamiento de la leishmaniasis¹¹⁻¹⁴. Con esta metodología se ha demostrado que los pacientes infectados por el VIH son altamente infectivos para los flebotomos^{12,13}.



Detection of high *Leishmania infantum* loads in *Phlebotomus perniciosus* captured in the leishmaniasis focus of southwestern Madrid region (Spain) by real time PCR



Estela González, Ana Álvarez, Sonia Ruiz, Ricardo Molina, Maribel Jiménez*

Unidad de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Phlebotomus perniciosus
qPCR
Leishmania infantum loads
Human leishmaniasis outbreak of
M
adrid

ABSTRACT

Since 2010 a human leishmaniasis outbreak has been notified in southwestern Madrid region that still remains active. Entomological surveys have been carried out in the affected area in order to obtain information about species diversity, distribution, and density of sand flies. Moreover, molecular identification of blood meal preferences of sand flies and molecular detection of *Leishmania infantum* has been performed. In this work, we optimized a real time PCR assay in order to determine parasite loads in unfed and blood-fed *Phlebotomus perniciosus* female sand flies caught in the focus area. Results showed elevated parasite loads in nearly 70% of the studied positive sand flies. Furthermore, significantly higher parasite loads were observed in females without blood in their guts. In conclusion, high *L. infantum* loads found in *P. perniciosus* sand flies from the Madrid focus support the exceptional characteristics of this outbreak.

1. Introduction

Leishmaniasis is a globally spread vector-borne disease caused by trypanosomatids of genus *Leishmania* and transmitted by phlebotomine sand fly bites. Southern Europe region is considered as a hypoendemic region for leishmaniasis (World Health Organization, 2010). In particular, Spain has registered an increase of visceral and cutaneous leishmaniasis human cases since 2010 when an outbreak of this disease located in the southwest of the Community of Madrid was detected (Arce et al., 2013; Gomez-Barroso et al., 2015). Since then, several studies have been performed in order to characterize this outbreak. Different factors related to the urbanization and changes in land use in the affected area of Madrid have been involved in the hypothesis about this leishmaniasis re-emergence, favoring the parasite transmission among wild animals of the green areas surrounding the municipalities affected by the outbreak. In this way, studies carried out elsewhere suggest that human intervention in many areas leads to a change in the transmission cycle of parasites by increasing exposure of infected vectors and susceptible reservoirs (Harhay et al., 2011). Hares and rabbits from the aforementioned region have been incriminated in the transmission of *Leishmania infantum*, demonstrating that a sylvatic cycle has been taking place (Jiménez et al., 2014; Molina et al., 2012). On the other hand, *Leishmania* parasites isolated from patients from the focus,

as well as from wild reservoirs and sand flies collected in the same area, have been characterized by molecular procedures showing the same genotype of *L. infantum* (Chicharro et al., 2013; Jiménez et al., 2014; Molina et al., 2012). Additionally, a great virulence of the *L. infantum* strain circulating in the focus area has been reported (Dominguez-Bernal et al., 2014).

Systematic entomological captures have been carried out in the focus since 2011 demonstrating that the predominant sand fly species is *Phlebotomus perniciosus* (Alten et al., 2016; Tello et al., 2015), which is the main vector of leishmaniasis in Spain. Both molecular detections by conventional PCR and dissections performed with *P. perniciosus* females collected throughout these surveys show high *L. infantum* infection rates, although parasite loads have not been determined (Jiménez et al., 2014, 2013; data not published). At present, many studies have been performed for diagnostic purposes by using real time PCR (qPCR) assay for *Leishmania* detection and quantification. Thus, a qPCR targeting kDNA detection in fresh blood and tissue has also been developed by Mary et al. (2004) and Nicolas et al. (2002). Similarly, Abbasi et al. (2013) developed a qPCR in order to detect and quantify *Leishmania donovani* in human dried-blood. *Leishmania* species discrimination has been studied by qPCR in human samples (Weirather et al., 2011). Moreover, parasite loads in spleen have been correlated with blood parasite burden in visceral leishmaniasis using qPCR (Sudarshan et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: mjimenez@isci.es (M. Jiménez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.03.023>

Received 2 December 2016; Received in revised form 20 March 2017; Accepted 24 March 2017

Available online 27 March 2017

0001-706X/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

RESEARCH

Open Access



Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences

Estela González, Maribel Jiménez^{*,†}, Sonia Hernández, Inés Martín-Martín and Ricardo Molina^{*,†}

Abstract

Background: An unusual increase of human leishmaniasis cases due to *Leishmania infantum* is occurring in an urban area of southwestern Madrid, Spain, since 2010. Entomological surveys have shown that *Phlebotomus perniciosus* is the only potential vector. Direct xenodiagnosis in hares (*Lepus granatensis*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) collected in the focus area proved that they can transmit parasites to colonized *P. perniciosus*. Isolates were characterized as *L. infantum*. The aim of the present work was to conduct a comprehensive study of sand flies in the outbreak area, with special emphasis on *P. perniciosus*.

Methods: Entomological surveys were done from June to October 2012–2014 in 4 stations located close to the affected area. Twenty sticky traps (ST) and two CDC light traps (LT) were monthly placed during two consecutive days in every station. LT were replaced every morning. Sand fly infection rates were determined by dissecting females collected with LT. Molecular procedures applied to study blood meal preferences and to detect *L. infantum* were performed for a better understanding of the epidemiology of the outbreak.

Results: A total of 45,127 specimens belonging to 4 sand fly species were collected: *P. perniciosus* (75.34%), *Sergentomyia minuta* (24.65%), *Phlebotomus sergenti* (0.005%) and *Phlebotomus papatasi* (0.005%). No *Phlebotomus ariasi* were captured. From 3203 *P. perniciosus* female dissected, 117 were infected with flagellates (3.7%). Furthermore, 13.31% and 7.78% of blood-fed and unfed female sand flies, respectively, were found infected with *L. infantum* by PCR. The highest rates of infected *P. perniciosus* were detected at the end of the transmission periods. Regarding to blood meal preferences, hares and rabbits were preferred, although human, cat and dog blood were also found.

Conclusions: This entomological study highlights the exceptional nature of the *Leishmania* outbreak occurring in southwestern Madrid, Spain. It is confirmed that *P. perniciosus* is the only vector in the affected area, with high densities and infection rates. Rabbits and hares were the main blood meal sources of this species. These results reinforce the need for an extensive and permanent surveillance in this region, and others of similar characteristics, in order to control the vector and regulate the populations of wild reservoirs.

Keywords: *Phlebotomus perniciosus*, *Leishmania infantum*, Human leishmaniasis, PCR, Blood meal preferences, Sand fly infection rates, Southwestern Madrid, Central Spain

* Correspondence: mjimenez@isciii.es; rmolina@isciii.es

[†]Equal contributors

Laboratorio de Entomología Médica, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Leishmaniasis is caused in Spain by the trypanosomatid *Leishmania infantum* and visceral, cutaneous and mucosal forms of the disease are notified in the country, although these last two are underestimated because they are usually unnoticed [1–3]. Phlebotomine sand flies are the cornerstone in the transmission of leishmaniasis in many geographical regions of the world including the countries of the Mediterranean basin. The deep knowledge of wild cycles of *Leishmania* is still scarce despite being a very important aspect in the epidemiology of the disease. The proven vectors implicated in the transmission are *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi* [4]. Most of cases of leishmaniasis are reported in the Mediterranean coast and in central region of Spain [2]. During the period 2000–2009, 12–25 annual cases were reported in the region of Madrid (central Spain), but since 2010 an unusual increase of both visceral and cutaneous leishmaniasis cases was observed in southwestern Madrid region, mainly in four urban areas: Fuenlabrada, Leganés, Getafe and Humanes de Madrid [5, 6]. A total of 691 human cases were reported in this area between 2010 and October 2016, Fuenlabrada being the most affected town by far, where the mean incidence reached 45.17 cases/100,000 inhabitants (data provided by the Community of Madrid).

The periurban area close to the focus was traditionally used for agricultural purposes with a significant presence of hares (*Lepus granatensis*) [7]. Recently, it was modified in order to create a large green park for the enjoyment of the population living in the area. This change in land use has led to an increase of both hare and wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) populations in this open space and has probably increased the population densities of sand fly vectors. Studies carried out in this leishmaniasis focus using direct xenodiagnosis have involved hares and rabbits from the area as wild reservoirs of the disease since they were able to transmit the parasite to colonized *P. perniciosus* sand flies [8, 9]. Even more, it has been demonstrated a high exposure of these lagomorphs to *P. perniciosus* bites [10]. On the other hand, high levels of leishmaniasis seroprevalence have been detected in hares and rabbits from this area [11]. These findings suggest that a sylvatic cycle of transmission of *Leishmania* exists in this periurban park independent of the classical urban domestic cycle with dog as the main reservoir [8]. Additional studies carried out in Madrid and in other regions of Spain strengthen the implication of lagomorphs in the sylvatic cycle of *L. infantum* in the country [12–14].

On the other hand, several factors associated to human activity and climate change are influencing *Leishmania* distribution in some parts of the world [15]. Studies have reported changes in sand fly distribution, as well as risk for their establishment in new areas of Europe [16].

Specifically, in the Iberian Peninsula epidemiological and entomological studies have been performed in order to update and improve the knowledge of the eco-epidemiology of leishmaniasis and the distribution of its vectors [17–20]. In most of these studies entomological surveys when combined with molecular procedures demonstrate to be worthwhile in the understanding of the epidemiology of leishmaniasis.

This work aimed to carry out a detailed entomological survey in order to obtain information about sand fly seasonal trends and densities, the evolution of sand fly infection rates, and their blood meal preferences in the exceptional human focus of leishmaniasis that is affecting urban areas of the southwestern Madrid region (Spain).

Methods

Study area

The entomological surveys were conducted in a periurban green park of around 450 ha surrounded by the towns of Fuenlabrada, Leganés and Getafe (Madrid, Spain), the area affected by the leishmaniasis outbreak (Fig. 1). Three stations located in the bordering zone of the park with the urban area of the town of Fuenlabrada were chosen for the study, named ATE (40.292849N, 3.780539W), BOS (40.298084N, 3.793136W) and JIC (40.299954N, 3.806019W). A fourth station located inside the green park belonging to the municipality of Leganés was also selected, named POL (40.324903N, 3.796381W) (Fig. 1). These four stations were selected according to the high number of sand flies collected in a preliminary survey performed in 2011. The altitude of these stations varies from 655 to 691 m. The studied area belongs to the meso-Mediterranean bioclimatic zone, with an annual average temperature of 15 °C and annual precipitation of 365 mm (data from the Spanish Meteorological Agency). The characteristics of the soil for traditional rainfed cultivation make the area an exceptional habitat for hare and rabbit. The stations JIC, BOS and ATE are located in the contact line between the urban area and the green park where rabbits are abundant. In contrast, POL station is located in the middle of the green park where hares are the predominant leporids. Occasional colonies of stray cats can also be seen.

Sand fly collection and identification

Sand flies were collected every month for three successive years (2012, 2013 and 2014) in the active season of sand flies, from June to October. Twenty sticky traps (ST) (20 × 20 cm paper sheets soaked in castor oil) and two CDC miniature light traps (LT) were used during two consecutive nights in each station. LT were replaced every morning (Fig. 1). Temperature and relative humidity (RH) were registered every 10 min using data loggers (Velleman® DVM171HD, Gavere, Belgium) hanging on



Fig. 1 Map of the area of study in southwestern region of Madrid (Spain) showing the location of the four stations selected

each LT, with the exception of June 2012 in which the data were obtained from the nearest meteorological station located in Getafe. For phenology studies mean temperature and RH registered from dusk to dawn were used, according to information provided by the National Astronomical Observatory (Madrid).

Sand flies collected by ST were detached from the paper sheets using a fine brush, placed in 96% ethanol (to remove the castor oil) and then stored in 70% ethanol at 4 °C until processing. Female sand flies collected with LT were immediately dissected. Non-dissected females as a result of the high number of catches obtained in some cases and all males were stored in 70% ethanol at 4 °C. Blood-fed sand flies from both LT and ST were separated and stored in 70% ethanol at 4 °C for subsequent molecular studies.

Taxonomical identification of the collected sand flies was based on the morphology of the male genitalia and spermathecae of females according to Gil-Collado et al. [21]. Female genitalia was cleared in Marc-André medium and transferred together with the head to a drop of Hoyer's mounting medium on a glass slide for identification under a microscope.

Isolation of promastigotes from infected sand flies and further characterization

Isolation method

Alive female sand flies collected with LT were anesthetized with CO₂ and placed in a sterile Petri dish containing 5% detergent solution in sterile PBS. They were then individually transferred to a drop of sterile PBS placed on a sterilized glass slide. Sand flies were dissected by using flame-disinfected entomological

needles and examined for the presence of promastigotes under a phase-contrast microscope [22]. Promastigotes from guts of infected sand flies were transferred to screw cap tubes containing 200 µl of M199 medium supplemented with 20% fetal calf serum (FCS) (Hyclone™, GE Healthcare Life Science, Logan, Utah, USA) and 1.6% penicillin-streptomycin (10,000 U/ml of each antibiotic), pH 7.4 (Lonza BioWitthaker®, Verviers, Belgium). After 3–4 days at 27 °C positive vials containing live promastigotes were transferred to Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium with RPMI medium for mass growth of promastigotes and further characterization of the isolates. Finally, after 1–4 weeks the promastigote cultures were stored in liquid nitrogen, depending on the evolution of their growth.

DNA extraction

Sand flies preserved in 70% ethanol were washed individually in sterile distilled water placed in ELISA microtiter plates. Afterwards, head, wings, genitalia, and legs of each female sand fly were removed. The genitalia and the head were processed for taxonomical identification as previously described. The presence of a blood meal was determined by observation under a stereomicroscope. The phase of blood digestion was determined according to Dolmatova & Demina [23]. Thorax and abdomen of each sand fly were used for DNA extraction using the DNeasy® Blood & Tissue Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA from promastigote cultures was obtained by using the same kit. In both cases, two DNA elutions of 100 µl were obtained and further quantification and purity were determined by spectrophotometry

with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Finally, samples were stored at -20 °C until use.

Molecular characterization

Molecular characterization of the isolates was carried out by amplification of internal transcribed spacer regions 1 (ITS1) and 2 (ITS2) using the two pairs of primers as described in previous studies [9, 24]: (i) LITSR (5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3') and L5.8S (5'-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3') and (ii) L5.8SR (5'-AAG TGC GAT AAG TGG TA-3') and LVTSTV (5'-ACA CTC AGG TCT GTA AAC-3'). PCR products were separated on 1.5% agarose gel (Conda, Torrejón de Ardoz, Spain) stained with "Pronasafe Nucleic Acid Staining Solution" (10 mg/ml) (Conda, Torrejón de Ardoz, Spain) and visualized under UV light. Bands obtained were removed from the gel under UV exposure and purified with the QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Afterwards, the DNA samples were sequenced with ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Electropherograms were manually inspected and corrected using ChromasPro program (McCarthy, Queensland, Australia). Nucleotide sequences obtained were analysed with DNASTAR program (Lasergen v7.1, Madison, WI, USA). Homologies with the available sequences data in GenBank was carried out with the software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Blood-feeding preferences of sand flies

Blood meal identification of blood-fed sand flies was conducted by the amplification of a fragment of 359 bp of vertebrate cytochrome *b* (*cyt b*) gene followed by sequencing as described before [9, 24]. Universal primers cyto 1 (5'-CCA TCA AAC ATC TCA GCA TGA AA-3') and cyto 2 (5'-CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC-3') [25] were used. Degenerated primers *cyt_bb1* (5'-CCA TCM AAC ATY TCA DCA TGA TGA AA-3') and *cyt_bb2* (5'-GCH CCT CAG AAT GAY ATT TGK CCT CA-3') were used in samples unsuccessfully amplified with non-degenerated primers [26]. In the case of *Sergentomyia minuta* blood meal identification, degenerated primer for reptiles (5'-GCH GAY ACH WVH HYH GCH TTY TCH TC-3') combined with primer cyto 2 was used [27]. Band purification and subsequent sequencing were carried out as previously described.

Molecular detection of *Leishmania* DNA in sand flies

Detection of *Leishmania* was carried out by amplification of a 120 bp fragment from kDNA and further confirmation by cysteine proteinase *b* (*cpb*)-PCR following previous protocols [24]. DNA obtained from sand flies reared in the laboratory was used as negative control. DNA of *L. infantum* was used as a positive control. To prevent PCR

contamination, sample preparation, reactions set-up, and PCR amplifications were performed in separate rooms, using different lab coats and gloves.

Data analysis

Relative abundance (RA) of each species was assessed by using LT (sand flies captured of one specific species/total sand flies captured by LT), while density was calculated by using sand flies collected by ST (number of sand flies captured per m² of recovered ST). Sex ratio was calculated as the number of males/females × 100.

Statistical analysis with Kruskal-Wallis test was performed in order to study significant differences in sand fly captures, density, RA, temperature and RH between the three survey periods. For the analysis of bioclimatic parameters in June, Mann-Whitney test was performed in order to compare 2013 and 2014 data. Dunn's multiple comparison tests was used to analyse differences between mean values of the mentioned parameters between each period and month. The possible relation between sand fly captures during the three periods and bioclimatic parameters (mean/ maximum/minimum temperature and RH) was determined using the Spearman's correlation test. Analyses were only performed with *P. perniciosus* and *S. minuta* data.

Results

Sand fly identification and general data

A total of 45,127 specimens were collected during the three survey periods: 2012 ($n = 17,317$); 2013 ($n = 12,407$); and 2014 ($n = 15,403$). A total of 16,502 sand flies were captured by LT and 28,625 were captured by ST. The two predominant species captured were *P. perniciosus* and *S. minuta*. There were no statistically significant differences between LT captures among the three periods (Kruskal-Wallis H-test: $\chi^2 = 5.9915$, $df = 2$, $P = 0.3833$ for *P. perniciosus*, $P = 0.7591$ for *S. minuta*). No significant differences were found between *P. perniciosus* and *S. minuta* captured by ST among the three surveys, $P = 0.4441$, $P = 0.5824$, respectively. Concerning the four stations studied, the highest number of sand flies was found in JIC ($n = 17,398$), followed by ATE ($n = 12,768$), BOS ($n = 9158$) and POL ($n = 5803$). The same correlation was separately observed in the collections obtained with both LT and ST, although numbers and species of sand fly captured by each method was very variable depending on the station as shown in Fig. 2. Statistical analysis through the Kruskal-Wallis test showed no significant differences in *P. perniciosus* collections between the four stations with both capture traps (Kruskal-Wallis H-test: $\chi^2 = 7.8147$, $df = 3$, $P = 0.333$, $P = 0.0877$ for LT and ST, respectively). However, *S. minuta* captures showed significant differences (Kruskal-Wallis H-test, $\chi^2 = 7.8147$, $df = 3$; $P = 0.0328$ and $P = 0.0003$ for LT and

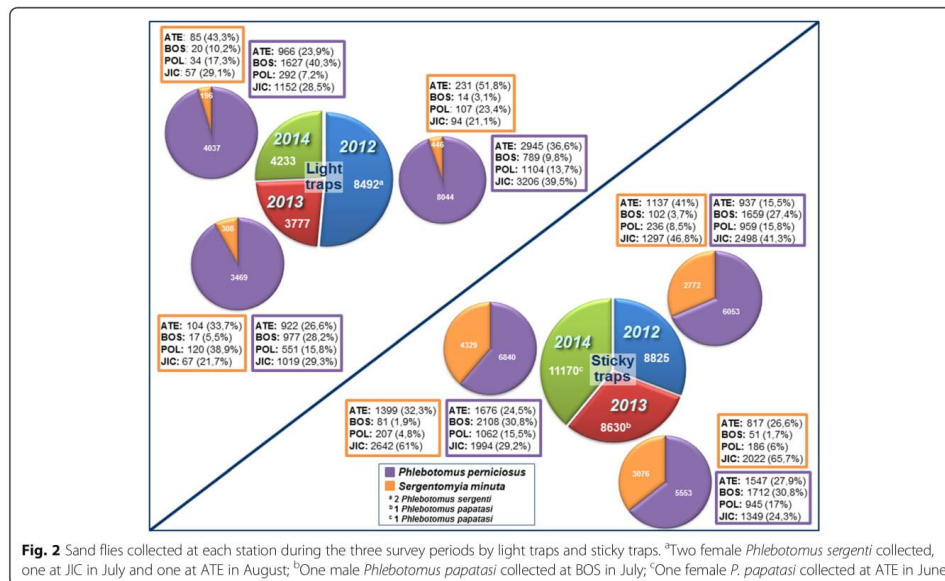


Fig. 2 Sand flies collected at each station during the three survey periods by light traps and sticky traps. ^aTwo female *Phlebotomus sergenti* collected, one at JIC in July and one at ATE in August; ^bOne male *Phlebotomus papatasi* collected at BOS in July; ^cOne female *P. papatasi* collected at ATE in June

ST, respectively). Dunn's multiple comparison test showed significant differences in ST captures between stations BOS and JIC ($P = 0.0195$).

Four sand fly species were identified: *P. perniciosus* ($n = 33,996$; 75.34%), *Phlebotomus sergenti* ($n = 2$; 0.005%), *Phlebotomus papatasi* ($n = 2$; 0.005%) and *S. minuta* ($n = 11,127$; 24.65%). No *P. ariasi* was found. *Phlebotomus sergenti* ($n = 2$) were captured by LT in 2012 (1 in August-ATE and 1 in July-JIC). *Phlebotomus papatasi* ($n = 2$) were collected by ST in 2013 (July-BOS) and in 2014 (June-ATE). Mean density of *P. perniciosus* captured with ST in the three surveys was 193.6 specimens/m². During the three surveys mean densities were 190.1, 175.72 and 220.45 specimens/m² in 2012, 2013 and 2014, respectively. In the case of *S. minuta* the mean density was 106.81 specimens/m², with variation between the surveys (87.06 in 2012; 97.34 in 2013 and 135.96 in 2014). Mean density of *P. papatasi* was 0.021 specimens/m². Density values of *P. perniciosus* and *S. minuta* did not show significant variation between the three surveys (Kruskal-Wallis H-test: $\chi^2 = 5.9915$, $df = 2$, $P = 0.4163$, $P = 0.5824$, respectively).

Regarding to RA calculated from LT captures, the mean value for *P. perniciosus* was 94.24%. Variation through the three periods was 94.74%, 91.85% and 95.37% in 2012, 2013, and 2014, respectively. This variation was not significant (Kruskal-Wallis H-test: $\chi^2 = 5.9915$, $df = 2$, $P = 0.0853$). With regard to *S. minuta*, RA mean value

was 5.75%. RA fluctuation through the three periods was 5.24% in 2012, 8.15% in 2013 and 4.63% in 2014, showing no significant deviation (Kruskal-Wallis H-test: $\chi^2 = 5.9915$, $df = 2$, $P = 0.4441$). The mean RA value for *P. sergenti* was 0.012% (Table 1).

Captures with LT showed a clear predominance of *P. perniciosus*. This species showed a peak in August 2012 and in September in 2013 and 2014 (Fig. 3). Although only significant variation was found in monthly captures of *S. minuta* during the three periods (Kruskal-Wallis H-test: $\chi^2 = 5.9915$, $df = 2$; $P = 0.0766$, $P = 0.0025$, for *P. perniciosus* and *S. minuta*, respectively). Specifically, multiple comparison tests showed significant variation in *S. minuta* captures between August and October ($P = 0.0467$). The difference between the two predominant species was less marked with ST (Fig. 4). In any case, the number of *P. perniciosus* captured was higher than *S. minuta*, with the exception of August 2013 and 2014. *Phlebotomus perniciosus* density showed two peaks in June and August 2012, while in 2013 a weak peak in July and a higher one in September were observed. In 2014, *P. perniciosus* density only showed one peak (September). On the other hand, *S. minuta* showed a peak in August during the three periods studied; however, in September 2014 the captures also remained high (Fig. 4). Significant differences in *P. perniciosus* monthly densities between each period were found (Additional file 1: Table S1).

Table 1 Sand fly collections, male rate, density and relative abundance

	Year	2012					2013					2014					Total				
		<i>P. perniciosus</i>	<i>S. minuta</i>	<i>P. sergenti</i>	Total		<i>P. perniciosus</i>	<i>S. minuta</i>	<i>P. papatasi</i>	Total		<i>P. perniciosus</i>	<i>S. minuta</i>	<i>P. papatasi</i>	Total		<i>P. perniciosus</i>	<i>S. minuta</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>P. papatasi</i>	Total
Sticky trap	No. of collected sand flies	6053	2772	0	8825	5553	3076	1	8630	1	11,170	6840	4329	1	11,170	18,446	10,177	0	2	28,625	
	Male rate (%)	89.98	59.87	0	–	90.96	56.6	100	–	89.77	56.78	0	–	–	–	90.2	56.75	0	50	–	
	Density (sand flies/m ²)	190.1	87.05	0	–	175.72	97.34	0.031	–	220.45	135.96	0.031	–	–	–	193.60	106.81	0	0.021	–	
Light trap	No. of collected sand flies	8044	446	2	8492	3469	308	0	3777	4037	4233	15,550	950	2	0	16,502	15,550	950	2	0	16,502
	Male rate (%)	46.57	68	0	–	60.1	50.32	0	–	57.4	75	0	–	–	–	53.13	63.72	0	0	–	
	Relative abundance (%)	94.74	5.24	0.02	–	91.85	8.15	0	–	95.37	4.63	0	–	–	–	94.21	5.75	0.012	0	–	

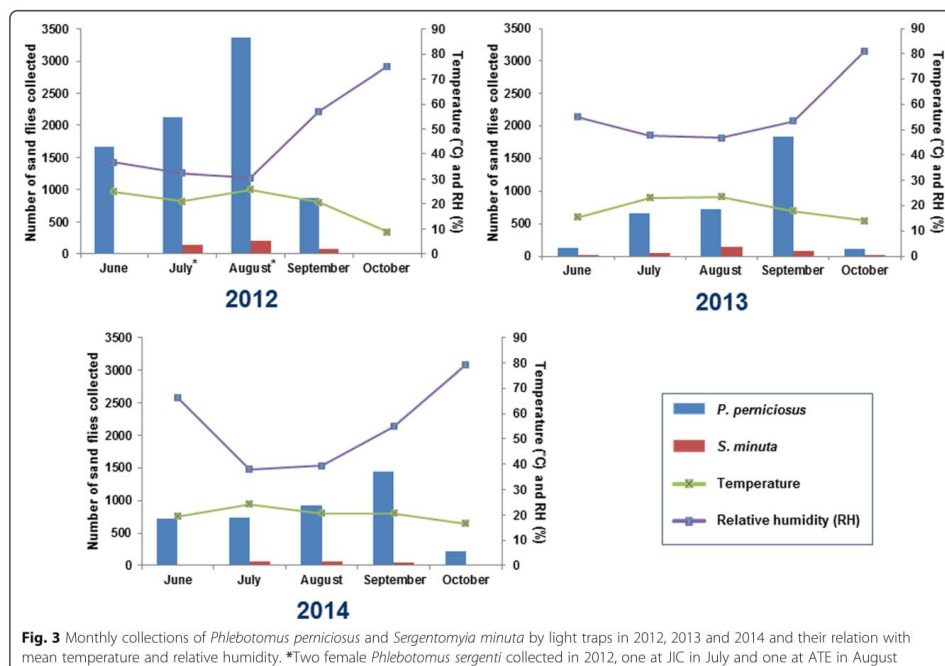


Fig. 3 Monthly collections of *Phlebotomus perniciosus* and *Sergentomyia minuta* by light traps in 2012, 2013 and 2014 and their relation with mean temperature and relative humidity. *Two female *Phlebotomus sergenti* collected in 2012, one at JIC in July and one at ATE in August

Phlebotomus perniciosus male rate exceeded 50% with both LT and ST during all surveys, except with LT in 2012 whereas *S. minuta* male rate also appeared more than 50% in ST during the three surveys periods (Table 1).

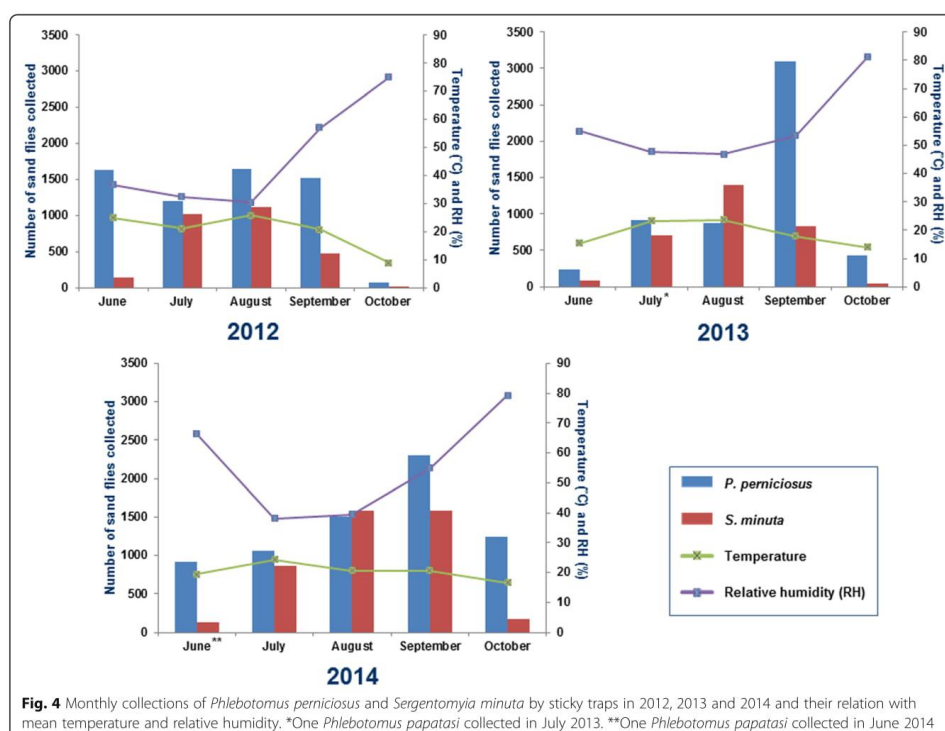
Bioclimatic parameters variation and relation with sand fly captures

Relative humidity and temperature of this study corresponds to values recorded between dusk and dawn of the two nights of each survey. The different bioclimatic parameters studied in this work presented fluctuations between the three survey periods. On one hand, mean RH presented significant variation in June (Kruskal-Wallis H-test: $\chi^2 = 5.9915$, $df = 2$; $P = 0.0286$). On the other hand, Dunn's test of maximum RH showed significant differences between July 2012, 2013 ($P = 0.0003$); August 2012, 2013 ($P = 0.0442$) and August 2012, 2014 ($P = 0.0001$). Regarding minimum RH, Dunn's test showed significant differences between August 2012, 2013 ($P = 0.0217$), August 2013, 2014 ($P = 0.0001$), October 2012, 2013 ($P = 0.0195$) and October 2012, 2014 ($P = 0.0001$) (Additional file 2: Table S2).

In case of temperature variation, no significant differences were found in monthly mean temperatures recorded

over the 3 years (Additional file 3: Table S3). However, maximum temperatures showed significant fluctuations during the three collection periods except in September (Kruskal-Wallis H-test: $\chi^2 = 5.9915$, $df = 2$; June, $P = 0.0002$; July, $P = 0.0468$; August, $P = 0.0007$; September, $P = 0.0621$; October, $P = 0.0003$). Regarding minimum temperatures significant differences were observed during the three sampling periods (Kruskal-Wallis H-test: $\chi^2 = 5.9915$, $df = 2$; June, $P = 0.0002$; July, $P = 0.0358$; August, $P = 0.0031$; September, $P = 0.0063$; October, $P = 0.0001$) (Additional file 3: Table S3).

Statistical analysis showed a negative correlation between sand flies captured during the surveys by LT and ST and mean, maximum and minimum RH (Spearman's rho = -0.4 – -1 , $n = 12$, $P = 0.5167$ – 0.0167) but the only significant negative correlation was only observed between *S. minuta* captured by LT and minimum RH (Spearman's rho = -1 , $P = 0.0167$) (Additional file 4: Table S4). Regarding temperature, sand fly captures positively correlated with mean temperature, maximum temperature and minimum temperature in both LT and ST (Spearman's rho = 0.4 – 1 , $n = 12$, $P = 0.5167$ – 0.0167) with a significant correlation only observed between *S. minuta* captured by LT and



maximum temperature values (Spearman's $\rho = 1$, $P = 0.0167$) (Additional file 4: Table S4).

Sand fly dissections, infection rates and molecular characterization of isolates

During the three survey periods, a total of 3203 *P. perniciosus* females collected with LT in the 4 stations of seasonal study were dissected. The global infection rate was 3.65%. In 2012, 19 out of 735 females dissected were found infected with promastigotes (2.6%). In 2013, 864 females were dissected with 57 of them infected, giving a rate of infection of 6.6%. In 2014, 1604 females were dissected and promastigotes were found in 41 specimens (2.6%). Of the dissected infected females 7.7% were gravid and 6% were semigravid. As shown in Fig. 5, infection rates dynamics fluctuated during the three periods, although 2013 was the period with highest infection rates. Specifically, an exceptional rate of infected sand flies was found by dissection in August and October 2013. Overall, sand fly dissections revealed higher parasite presence in August, September and October during the three periods. Of the isolates from dissected guts, 19.2% resulted contaminated by fungi or

bacteria and in the 5.1% of the cultures the growth of the parasites was unsuccessful due to the low number of promastigotes recovered from the infected guts. A total of 67 isolates were successfully cultured and this allowed proceeding to molecular characterization. ITS1 and ITS2 sequences were obtained and analysed by comparison with GenBank database. All the isolates showed an identity of 100% with *L. infantum* strain MHOM/ES/87/Lombardi (ITS type Lombardi; AJ000295) (Additional file 5: Figure S1).

Blood-feeding preferences and *Leishmania* detection by molecular procedures

A total of 912 *P. perniciosus* females were analysed during the study, 308 of them blood-fed. Host-feeding preferences of *P. perniciosus* were investigated over the 3 years of the study, 2012 ($n = 100$), 2013 ($n = 92$) and 2014 ($n = 116$). Blood identification was achieved in 224 blood-fed *P. perniciosus* females (efficiency of 74.36%). The rate of unidentified blood meal sources in *P. perniciosus* engorged females was similar along the 3 years of the study: 29%, 23.07%, and 25% in 2012, 2013 and 2014,

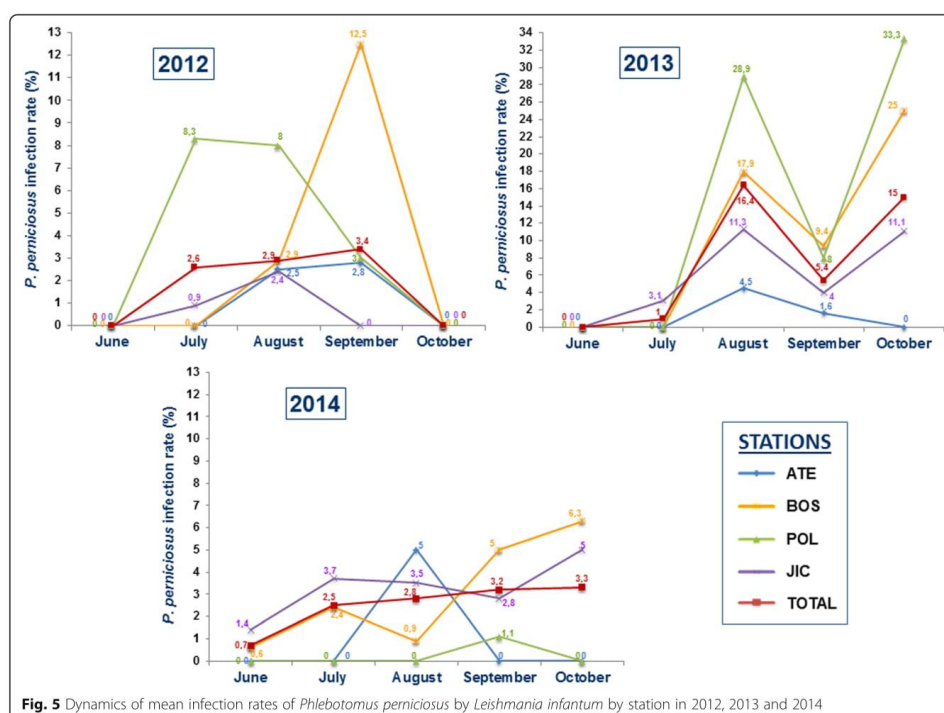


Fig. 5 Dynamics of mean infection rates of *Phlebotomus perniciosus* by *Leishmania infantum* by station in 2012, 2013 and 2014

respectively. The following hosts have been identified: rabbit (50.33%), hare (19.16%), cat (3.57%), human (0.97%) and dog (0.33%). Differences in the identified hosts were found between the three survey periods. The percentages of females fed on rabbits were increasing during the study: 41% in 2012, 50.54% in 2013, and 58.62% in 2014. In contrast, the rate of hares as blood meal source was decreasing, 28%, 17.58% and 12.93% in 2012, 2013 and 2014, respectively. Blood preferences by station are shown in Fig. 6. It is remarkable that most of hare blood was detected in sand flies collected in the station LEG-POL and the station with more variable blood meal sources was FUE-SJIC.

Additionally the blood contained in the gut of 30.3% (10 out of 33) *S. minuta* female could be identified. All these blood meals were identified as gecko blood.

Regarding to molecular detection of *Leishmania*, a total of 41 positive blood-fed *P. perniciosus* females were found (13.31%). Three positive females were gravid (7.3%) and two were semigravid (4.87%). 2012 was the period with highest rate of infection (23%), in 2013 the rate was 11.11% and 4.76% in 2014. Sixteen (69.56%) out of 23 positive female sand flies found in 2012 were

detected in POL station; 11 out of this 16 blood meal sources were identified as hare. Another two sand flies fed on rabbits were found positive in BOS station, and other 5 sand flies with unidentified blood meal source were found positive (2 in ATE and 3 in JIC stations). Ten out of 12 positive blood-fed females collected in 2013 were fed on rabbits (9 in BOS and 1 in ATE), in the other 2 flies the blood could not be identified (1 in BOS and 1 in POL). Finally, 3 out of 6 positive sand flies collected in 2014 were fed on rabbits and the other 3 on hares: 1 fed on hare in ATE, 2 fed on hares in POL and 3 fed on rabbits in BOS (Fig. 6). Infection rates of females fed on rabbits during the three collection periods were 4.97%, 21.74% and 4.41% in 2012, 2013 and 2014, respectively. As to the females fed on hares the infection rates were 39.28% in 2012, 0% in 2013 and 20% in 2014.

Concerning unfed females, 604 *P. perniciosus* were analysed for *Leishmania* detection: 225 collected in 2012; 192 in 2013 and 187 in 2014. A total of 47 females were positive for *Leishmania* (7.78%). The highest infection rate was found in 2013 (10.88%), followed by 2012 (6.69%) and 2014 (5.88%). Only one positive gravid female (2.12%) was observed. During the three survey

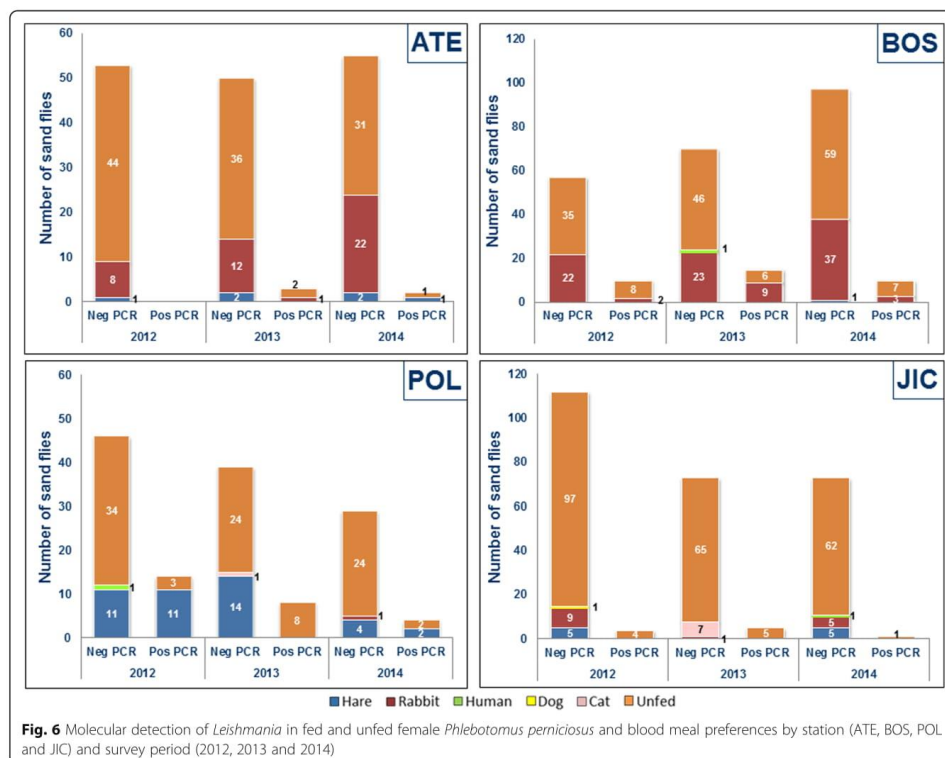


Fig. 6 Molecular detection of *Leishmania* in fed and unfed female *Phlebotomus perniciosus* and blood meal preferences by station (ATE, BOS, POL and JIC) and survey period (2012, 2013 and 2014)

periods, BOS was the station with higher number of infected sand flies, 21 (32.30%), followed by POL, 13 (11.71%), JIC, 10 (4.13%) and ATE, 3 (2.36%). Additionally, 40 *S. minuta* females were also investigated but no trypanosomatids were detected (Fig. 6).

Discussion

In this work we present results on sand fly seasonal dynamics, as well as findings about sand fly infection rates and blood meal preferences in the exceptional outbreak of human leishmaniasis in an urban area of the southwestern region of Madrid (central Spain).

Anthropogenic land changes as deforestation-reforestation, road construction and urbanization seem to be a very important driver of infectious disease outbreaks giving raise to emergence or re-emergence events. These changes perturb host-parasite dynamics equilibrium in parasitic vectorial diseases, including leishmaniasis [15, 28]. The emergence of leishmaniasis in many areas can be associated with urbanization, ecological factors and climatic changes that favor the increase in vector densities and the

modification of host population or its composition [29, 30]. In the case of the studied area the high densities of *P. perniciosus* found in this work could be explained because of the alteration of the periurban area which was modified in order to establish an extensive green area surrounding the different affected towns. This alteration was expected to modify hare and rabbit populations in this open space and as result, the sand fly density has probably increased [6]. This finding agrees with observations on the plasticity and adaptability to environmental changes of *P. perniciosus* observed in Italy by Tarallo [31]. Moreover, environmental changes are proved to affect sand fly population and density [32–35].

During the three survey periods four different sand fly species were found: *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi* and *S. minuta*. Although *P. ariasi* have been recorded in some areas of Madrid region no specimen of this species was found in our surveys. Moreover, Tello et al. [36] only found one specimen during their collections in different sites of the affected area. We could not find any specific reason for the absence of this species, so it could be due

to the homogeneity of bioclimatic and ecological variables of the study area that are unsuitable for the presence of this sand fly species [37, 38]. *Phlebotomus perniciosus* was the predominant species and *S. minuta* was the second in abundance, contrary to what has been reported elsewhere in the Madrid region [37, 38], probably because bioclimatic and environmental conditions of the area of study are more favorable for the first species. The detection of *P. sergenti* and *P. papatasi* was sporadic throughout the study probably because the ecological variables of the study area are very uniform and do not favor their presence. Sand fly density in each station showed variation between survey periods. The high growth of the rabbit population observed in BOS during the three surveys could influence the high sand fly abundance observed in this station. With the exception of this location, captures tended to decrease or maintain, possibly as a result of the control measures taken in the outbreak area such as management actions and regulation of hare and rabbit densities. Furthermore, studies carried out in France state that an area with a mean sand fly density above 20 sand flies/m² is a zone with high leishmaniasis transmission [39]. According to this statement, the area studied in this work would be a zone at very high risk of transmission due to the elevated *P. perniciosus* density registered (193.60 specimens/m²). Differences observed between ST and LT are due to the fact that the former method captures sand flies by interception and the latter by attraction. Thus, *P. perniciosus* are more phototrophic than *S. minuta*, which explains the significant RA differences between the two species in the present study as previously reported [40]. However, these results are in contrast to previous studies which recorded higher *S. minuta* density than *P. perniciosus* by using ST [36, 37]. A possible explanation could be the extraordinary *P. perniciosus* population present in the area due to a convergence of factors as an extraordinary availability of wild leporids and favorable bioclimatic conditions. Moreover, the ST were not placed in barbicans, drainage holes in walls, nor tubes; they were placed at the base of the trunks of shrubs or trees, next to deep cracks of the ground, next to wire fences, on the grates of sinkholes of sewer network, and in the proximities of the rabbit burrows [40–42].

Seasonal dynamics of *P. perniciosus* by LT showed a confluent bi-modal pattern in which the convergence of similar density peaks comprising June to September captures was observed (Fig. 3). However, a maximum peak of captures was found in August 2012, the month with lowest mean RH and highest mean temperature, which is in line with statistical analysis of correlation between captures and bioclimatic parameters. In the case of peaks of maximum number of captures observed in September 2013 and 2014 no significant correlation was observed, so other parameters such as wind, temperature and RH in

the days leading up to sampling, or even the climatic conditions prevailing in the spring or winter, might have affected sand fly captures [42]. Using ST we also observed a confluent bi-modal pattern during the three periods (Fig. 4). Just like with LT, 2012 results agreed with correlation analyses; however, 2013 and 2014 surveys did not. Confluent bi-modal pattern was also described in other studies in the Mediterranean basin [42], although it is very similar to the bi-modal pattern previously reported in Spain [43–45]. In case of *S. minuta* dynamics, LT captures were not significant enough to detect a pattern. However, using ST, the maximum peak in every period was in August, the month when highest temperatures and lowest RH were recorded, except in 2014 where *S. minuta* captures remained very high in September. *Sergentomyia minuta* collections agreed with the results obtained in the correlation analysis. This kind of correlation between RH and temperature has been previously reported in entomological studies carried out in the Mediterranean region [46].

Prevalence studies of *Leishmania* infection in the phlebotomine vectors are worthwhile indicator of the intensity of *Leishmania* transmission. In the present study, we combined classical demonstration of *Leishmania* promastigotes by dissection of sand fly guts and molecular detection and identification of the parasite using PCR. Although the microscopic detection of promastigotes in the gut of dissected sand flies is a very tedious task that requires highly skilled personnel, it allows the isolation and culture of the parasite and its preservation for further studies. It also enables the incrimination of sand fly vector species in *Leishmania* foci. In contrast, molecular procedures are very accurate and less laborious than sand fly dissection. Nevertheless, the combination of these two methodologies allows an extensive and comprehensive study of infection rates and characterization of *Leishmania* parasites as reported in Italy, Turkey and Israel [47–49]. Mean infection rates found by dissection in the present work are similar to some studies carried out in Spain [4, 50–53] but higher than reported in other countries [26, 47, 48, 54]. The infection rates found in this study showed different pattern during the three surveys, possibly due to differences observed in the number of sand fly captures. Specifically, the higher infection rate found in 2013 could be linked to the increase in the human leishmaniasis cases in early 2014. In addition, the highest rates of infection were observed in months with low number of sand fly captures and by the end of the seasonal activity of sand flies, as previously reported in other studies [50, 55]. The isolates in this work were characterized as ITS-Lombardi genotype. This ITS type is identical to that reported from direct xenodiagnoses carried out in hares and rabbits from the affected area [8, 9], as well as from samples obtained from patients from the outbreak [56].

On the other hand, the detection of *Leishmania* DNA by PCR shows high values in fed (13.35%) and unfed females (7.78%). These findings disagree with data we reported before [24], possibly because of the low number of specimens analyzed in the latter study, all of them captured in October 2011 when infection rates are usually the highest. On the other hand, the results from the present study agree with other studies where infection rates of fed female sand flies are higher than in unfed [47, 57, 58]. Moreover, an elevated infection rate was found in females fed on hares, mostly in the 2012 survey. These samples represent an important number of the fed females and could influence the elevated rate of positive samples in this group. *Leishmania* detection by molecular procedures showed higher values than average rates detected by sand fly dissection, exhibiting more sensibility and accuracy. Regarding fed females, the highest rates of infection were detected in 2012 and showed a decline pattern in the following periods. This may be a result of the control measures taken in the park close to urban areas to reduce the population of hares and rabbits, potential wild reservoirs of leishmaniasis. In this way, we could verify that in 2013 and 2014 there was an elevated rabbit density in BOS, which correlates with the high sand fly infection rates found in this station. On the other hand, the drastic reduction in the number of hares in the POL station resulted in a considerably low *P. perniciosus* infection rate in 2014 (Fig. 6).

Although the leishmaniasis is considered a zoonotic disease in Spain with the dog as a main reservoir, in the focus area where this study was carried out, the prevalence of canine leishmaniasis has not undergone any increase. However lagomorphs seem to play a role as wild reservoirs of leishmaniasis in the area close the focus, as shown by direct xenodiagnoses in hares and rabbits [8, 9]. In a previous study of blood meal preferences performed in a small number of blood-fed *P. perniciosus* from the focus had already been shown that most of them were fed on rabbits and hares [9]. To find out more about host feeding preferences of sand flies collected in the park close the urban area of the focus, molecular procedures were applied. Global results of blood meal identification showed that *P. perniciosus* preferably feeds on rabbits, followed by hares, reinforcing the role these lagomorphs may be playing in the focus. Several studies on feeding habits of sand flies in *Leishmania* foci have reported an opportunistic behavior, finding engorged *P. perniciosus* females fed on different vertebrates, including humans, as well as mixed feeding sources [19, 47, 58]. In this way, a PCR restriction fragment length polymorphism methodology was optimized in order to discriminate mixed blood sources on sand flies captured in different areas of Spain [59]. Regarding the efficiency of blood-meal identification in *P. perniciosus* females, this was similar or higher to that

reported by other authors using the same methodology [17, 26, 58, 60]. The results obtained in the different stations showed that in BOS rabbit was the prevalent blood meal source, possibly due to the elevated population of this mammal observed in this station during the surveys. As early as 2011, the Community of Madrid warned about the existence of an extraordinary hare population in POL. Blood meal preferences found in this station correlate with this observation. However, the number of *P. perniciosus* fed on hares has been decreasing along the surveys probably due to the different measures implemented by the regional government in the frame of the control program of the disease. The host-feeding preferences found in this work are in concordance with studies which show that these two lagomorphs are highly exposed to *P. perniciosus* bites in the focus area [10]. In addition, sand flies fed on cats were found in JIC and POL, were some colonies of these animals were observed. The variation in blood-feeding preferences observed correlates with the opportunistic feeding behavior of *P. perniciosus* (Fig. 6) [61].

We are therefore facing an area with a high *L. infantum* transmission where intensive and continuous surveillance should be taken to regulate lagomorph populations and sand fly vector densities. Information about vectors and their distribution should be updated regularly in order to manage efficient control programs of leishmaniasis in the area. Moreover, surveillance programs of leishmaniasis should be undertaken in other geographic regions endemic for leishmaniasis with similar eco-epidemiological characteristics in order to keep track of the populations of sand fly vectors, the presence of the parasite in the sand flies and the potential wild reservoirs like the leporids.

Conclusions

Our entomological study carried out in the green park close to the urban areas of southwestern region of Madrid (Spain) affected by the outbreak of leishmaniasis revealed high densities of *P. perniciosus*, the only vector in the area. Infection rates by dissection of sand fly guts and by molecular procedures showed an important presence of *L. infantum* in the vector. From our study, it was also observed that rabbits and hares were the main blood meal sources of this sand fly species confirming the essential role of lagomorphs in sustaining the sylvatic *Leishmania* cycle in the green park.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Monthly relation of *P*-values of *P. perniciosus* and *S. minuta* densities through the three survey periods. Results of Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparison tests. (DOCX 18 kb)

Additional file 2: Table S2. Statistical analysis of RH through the three periods. Coefficient results from Kruskal-Wallis test and *P*-values resulting from Dunn's multiple comparison test. (DOCX 18 kb)

Additional file 3: Table S3. Statistical analysis of temperature through the three periods of the study. Coefficient results from Kruskal-Wallis test and P-values resulting from Dunn's multiple comparison test. (DOCX 20 kb)

Additional file 4: Table S4. Correlation analysis between *P. perniciosus* and *S. minuta* collections and bioclimatic parameters. Statistical results. (DOCX 20 kb)

Additional file 5: Figure S1. Alignment of ITS sequences of *Leishmania infantum* isolates from 2012, 2013 and 2014 and strains with different ITS types of *L. infantum* retrieved in the Genbank: type Lombardi (AJ000295), type A (AJ634341), type B (AJ000288), type A/B (AJ634355), type E (AJ634361) and type F (AJ634370). (PDF 1192 kb)

Acknowledgments

This study was partially sponsored and funded by: Dirección General de Salud Pública, Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid; Colegio de Veterinarios de Madrid; Colegio de Biólogos de Madrid and EU grant FP7-261504 EDENext (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

Funding

Estela González was supported by the Directorate-General for Public Health of the Community of Madrid. Instituto de Salud Carlos III, provided the equipment and facilities. European Union grant Frame Program7 EDENext (7-2011-261504) supported the design, collection, analysis and interpretation of data and writing the manuscript.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its additional files.

Authors' contributions

MJ and RM conceived, designed and coordinated the study. MJ, RM and EG carried out the field work. EG, MJ, RM and IMM performed the dissections and identifications of sand flies and the isolation of *Leishmania* isolates. EG and SH processed the traps and identified collected sand flies. EG, MJ and SH carried out the molecular studies in sand flies. EG, MJ and IMM performed the characterization of *Leishmania* isolates. EG carried out the statistical analysis of the data and wrote the first draft of the manuscript. EG, MJ and RM wrote the final draft of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

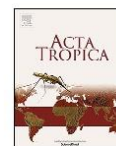
Received: 13 February 2017 Accepted: 25 July 2017

Published online: 01 August 2017

References

- World Health Organization. Control of Leishmaniases. 2010. WHO Technical Report Series no. 949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva.
- Gil-Prieto R, Walter S, Alvar J, Gil de Miguel A. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997–2008). *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85:820–5.
- Aliaga L, Cobo F, Mediavilla JD, Bravo J, Osuna A, Amador JM, et al. Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicine*. 2003;82:147–58.
- Rioux JA, Guilvard E, Gállego J, Moreno G, Pratlong F, Portús M, et al. *Phlebotomus aiasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania infantum* dans un même foyer: Infestations par deux zymodèmes syntopiques. A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne). In: Rioux JA, editor. *Leishmania*. Taxonomie et Phylogénèse. Applications écoépidémiologiques. Montpellier: IMEEE; 1986. p. 439–44.
- Suárez B, Isidoro B, Santos S, Sierra MJ, Molina R, Astray J, et al. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev Esp Salud Pública*. 2012;86:555–64.
- Arce A, Estrado A, Ordoñas M, Sevilla S, García N, Moratilla L, et al. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*. 2013;25:20546.
- Vilas F, Carpintero J, Sevilla S, Martínez A, Ordoñas M, Bernal J, et al. Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. Medidas de investigación y control medioambiental. *Profesión Veterinaria*. 2012;17:6–15.
- Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Irís A, Martín-Martín I, Sevillano O, et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol*. 2012;190:268–71.
- Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S, Molina R. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet Parasitol*. 2014;202:296–300.
- Martín-Martín I, Molina R, Rohousova I, Drahota J, Volf P, Jiménez M. High levels of anti-*Phlebotomus perniciosus* saliva antibodies in different vertebrate hosts from the re-emerging leishmaniosis focus in Madrid, Spain. *Vet Parasitol*. 2014;28:207–16.
- Moreno I, Álvarez J, García N, de la Fuente S, Martínez I, Marino E, et al. Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using indirect immunofluorescence antibody test. *Vet Parasitol*. 2013;199:264–7.
- Ruiz-Fons F, Ferroglio E, Gortázar C. *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004–2010. *Euro Surveill*. 2013;18:20541.
- Díaz-Sáez V, Merino-Espinosa G, Morales-Yuste M, Corpas-López V, Pratlong F, Morillas-Márquez F, et al. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and synanthropic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: epidemiological consequences. *Vet Parasitol*. 2014;202:119–27.
- García N, Moreno I, Álvarez J, de la Cruz MA, Navarro A, Pérez-Sancho M, et al. Evidence of *Leishmania infantum* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a natural area of Madrid, Spain. *Biomed Res Int*. 2014;2014:318254.
- Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*. 2010;15:19505.
- Medlock JM, Hansford KM, Van Bortel W, Zeller H, Alten B. A summary of the evidence for the change in European distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of public health importance. *J Vect Ecol*. 2014;39:72–7.
- Branco S, Alves-Pires C, Maia C, Cortes S, Cristóvão JMS, Gonçalves L, et al. Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, central region, Portugal. *Acta Trop*. 2012;125:339–48.
- Ballart C, Guerrero I, Castells X, Barón S, Castillejo S, Alcover MM, et al. Importance of individual analysis of environmental and climatic factors affecting the density of *Leishmania* vectors living in the same geographical area: the example of *Phlebotomus aiasi* and *P. perniciosus* in northeast Spain. *Geospat Health*. 2014;8:389–403.
- Maia C, Parreira R, Cristóvão JM, Freitas FB, Afonso MO, Campino L. Molecular detection of *Leishmania* DNA and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Portugal. *Parasit Vectors*. 2015;8:173.
- Bravo-Barriga D, Parreira R, Maia C, Afonso MO, Blanco-Ciudad J, Serrano FJ, et al. Detection of *Leishmania* DNA and blood meal sources in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in western of Spain: update on distribution and risk factors associated. *Acta Trop*. 2016;164:414–24.
- Gil-Collado J, Morillas-Márquez F, Sanchis-Marín MC. Los flebotomos en España. *Rev Sanid Hig Publica*. 1989;63:15–34.
- Rioux JA, Guilvard E, Dereure J, Lanotte G, Denial M, Pratlong F, et al. Infestation naturelle de *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786) par *Leishmania major* MON-25. A propos de 28 souches isolées dans un foyer du Sud marocain. In: Rioux JA, editor. *Leishmania*. Taxonomie et Phylogénèse. Applications écoépidémiologiques. Montpellier: IMEEE; 1986. p. 471–80.

23. Dolmatova AV, Demina NA. Les phlébotomes (Phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent. In: Étude anatomique et physiologique des *Phlebotominae* ailés. Paris: Editions Off Rech Sci Tech Outre-Mer; 1971. p. 89–95.
24. Jiménez M, González E, Iriso A, Marco E, Alegret A, Fuster F, et al. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol Res*. 2013;112:2453–9.
25. Abassi I, Cunio R, Warburg A. Identification of bloodmeals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome *b* PCR and reverse line blotting. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2009;1:79–86.
26. Svobodová M, Alten B, Získová L, Dvořák V, Hlaváčková J, Myšková V, et al. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *Int J Parasitol*. 2009;39:251–6.
27. Cupp EW, Zhang D, Yue X, Cupp MS, Guyer C, Sprenger TR, et al. Identification of reptilian and amphibian blood meals from mosquitoes in an eastern equine encephalomyelitis virus focus in Central Alabama. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71:272–6.
28. Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY. Effects of environmental changes on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol*. 2000;30:1395–405.
29. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*. 2011;27:403–9.
30. Aspöck H, Gersdorfer T, Formayer H, Walochnik J. Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change. *Wien Klin Wochenschrift*. 2008;120:24–9.
31. Tarallo VD, Dantas-Torres F, Lia RP, Ortranto D. Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy. *Acta Trop*. 2010;116:227–34.
32. Maroli M, Feliciangeli MC, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*. 2013;27:123–47.
33. Barón SD, Morillas-Márquez F, Morales-Yuste M, Díaz-Saez V, Irigaray C, Martín-Sánchez J. Risk maps for the presence and absence of *Phlebotomus perniciosus* in an endemic area of leishmaniasis in southern Spain: implications for the control of the disease. *Parasitology*. 2011;138:1234–44.
34. Fernández MS, Santini MS, Cavia R, Sandoval AE, Pérez AA, Acardi S, et al. Spatial and temporal changes in *Lutzomyia longipalpis* abundance, a *Leishmania infantum* vector in an urban area in northeastern Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:817–24.
35. Barhoumi W, Qualls WA, Archer RS, Fuller DO, Chelbi I, Chermi S, et al. Irrigation in the arid regions of Tunisia impacts the abundance and apparent density of sand fly vectors of *Leishmania infantum*. *Acta Trop*. 2015;141:73–8.
36. Tello A, González-Mora D, Outerelo R, Iriso A, Vázquez MA. The sand flies of the outbreak of leishmaniasis in south-west area of Madrid community (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Bol R Soc Esp Hist Nat Sec Biol*. 2015;109:57–64.
37. Conesa Gallego E, Romero Lozano E, Martínez Ortega E. Estudio de las poblaciones de flebotomos (Diptera, Psychodidae) de la Comunidad de Madrid (España). *Anales de Biología* 22 (Biología animal, 11); 1999. p. 43–50.
38. Gálvez R, Descalzo MA, Miró G, Jiménez MI, Martín O, Dos Santos-Brandao F, et al. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniasis sand fly vector abundances in central Spain. *Acta Trop*. 2010;115:95–202.
39. Rioux JA, Croset H, Lanotte G. Ecologie d'un foyer Méditerranéen de leishmaniose viscérale. Essai de modélisation. *Colloques Internationaux du CNRS*. 1977;239:295–305.
40. Alexander B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*. 2000;14:109–22.
41. Alten B, Ozbek Y, Ergunay K, Kasap OE, Cull B, Antoniou M, et al. Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Europe. *Bull Entomol Res*. 2015;14:1–15.
42. Alten B, Maia C, Afonso O, Campino L, Jiménez M, González E, et al. Seasonal dynamics of phlebotomine sand fly species proven vectors of Mediterranean leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(2):e0004458.
43. Morillas-Márquez F, Guevara Benítez DC, Ubeda Ontiveros JM, González CJ. Fluctuations annuelles des populations de phlébotomes (Diptera, Phlebotomidae) dans la province de Grenade (Espagne). *Ann Parasitol Hum Comp*. 1983;58:625–32.
44. Sanchis Marín MC, Morillas-Márquez F, González-Castro J, Benavides-Delgado I, Reyes MA. Dinámica estacional de los flebotomos (Diptera: Psychodidae) de la provincia de Almería (España). *Rev Iber Parasitol*. 1986;46:285–91.
45. Lucientes Curdi J, Benito de Martín MI, Castillo Hernández JA, Orcajo Teresa J. Seasonal dynamics of *Larrousius* species in Aragón (N.E. Spain). *Parassitologia*. 1991;33:381–6.
46. Prudhomme J, Rahola N, Toty C, Cassan C, Roiz D, Vergnes B, et al. Ecology and spatiotemporal dynamics of sand flies in the Mediterranean Languedoc region (Roquedur area, Gard, France). *Parasit Vectors*. 2015;8:642.
47. Rossi E, Bongiorno G, Ciolli E, Di Muccio T, Scalone A, Gramiccia M, et al. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop*. 2008;105:158–65.
48. Kavrur H, Eroglu F, Evyapan G, Demirkazik M, Alptekin D, Koltas IS. Entomological survey for sand fly fauna in Imamoglu Province (cutaneous leishmaniasis endemic region) of Adana, Turkey. *J Med Entomol*. 2015;52:313–8.
49. Faiman R, Abbasi I, Jaffe C, Motro Y, Nasereddin A, Schnur LF, et al. A newly emerged cutaneous leishmaniasis focus in northern Israel and two new reservoir hosts of *Leishmania major*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(2):e2058.
50. Morillas F, Sanchis-Marín MC, Martín-Sánchez J, Acedo SC. On *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera, Phlebotomidae) in the province of Almería in southeastern Spain. *Parassitologia*. 1991;33:437–44.
51. Gallego M, De Colmenares M, Castillejos S, Valls D, Riera C, Fisa R, et al. Estudio del parasitismo y de la edad fisiológica de los flebotomos del Priorato. *Lisboa: Acta del VIII Congreso Nacional de Parasitología*; 1993.
52. Morillas F, Sanchez Rabasco F, Ocaña J, Martín-Sánchez J, Ocaña-Wihelmi J, Acedo C, et al. Leishmaniasis in the focus of the Axarquía region, Málaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol Res*. 1996;82:569–70.
53. Lucientes Curdi J, Sánchez-Acedo C, Castillo-Hernández JA, Estrada-Peña A. Sobre la infección natural por *Leishmania* en *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 y *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, en el foco de leishmaniasis de Zaragoza. *Rev Iber Parasitol*. 1998;48:7–8.
54. Yaghoobi-Ershadi MR, Marvi-Moghadam N, Jafari R, Akhavan AA, Solimani H, Zahrai-Ramazani AR, et al. Some epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in a new focus, Central Iran. *Dermatol Res Pract*. 2015;2015: 286408.
55. Killick-Kendrick R, Rioux JA. Mark-release-recapture sand flies fed on leishmania dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia*. 2002;44:67–71.
56. Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, Nieto J, Moreno J, Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*. 2013;18:20545.
57. Tiwary P, Kumar D, Mishra M, Singh RP, Rai M, Sundar S. Seasonal variation in the prevalence of sand flies infected with *Leishmania donovani*. *PLoS One*. 2013;8(4):e61370.
58. Es-Sette N, Ajaoud M, Laamrani-Idrissi A, Mellouki F, Lemrani M. Molecular detection and identification of *Leishmania* infection in naturally infected sand flies in a focus of cutaneous leishmaniasis in northern Morocco. *Parasit Vectors*. 2014;7:305.
59. González E, Gállego M, Molina R, Abras A, Alcover MM, Ballart C, et al. Identification of blood meals in field captured sand flies by a PCR-RFLP approach based on cytochrome *b* gene. *Acta Trop*. 2015;152:96–102.
60. Paternina LE, Verbel-Vergara D, Romero-Ricardo L, Pérez-Doria A, Paternina-Gómez M, Martínez L, et al. Evidence for anthrophophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification bloodmeals. *Acta Trop*. 2016;153:86–92.
61. Bongiorno G, Habluetzel A, Khoury C, Maroli M. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop*. 2003;88:119–23.



Rabbit trypanosome detection in *Phlebotomus perniciosus* sand flies from the leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain



E. González, R. Molina*, M. Jiménez*

Laboratorio de Entomología Médica, Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo s/n, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Phlebotomus perniciosus
Trypanosoma nabiassi
Leishmania infantum
Oryctolagus cuniculus
 Human leishmaniasis focus
 Southwestern Madrid (Spain)

ABSTRACT

Phlebotomine sand flies are known vectors of several pathogens. In Spain, *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi* are the proven vectors of *Leishmania infantum*. Since 2010 a human leishmaniasis outbreak has been notified in Madrid region, central Spain. Studies have shown that *P. perniciosus* is the only vector confirmed in the focus area and that rabbits and hares are the wild reservoirs incriminated in the cycle of the parasite in the outbreak. *Trypanosoma nabiassi* is a trypanosomatid found in wild rabbits and its presence has been reported in wild rabbits from southern Spain. Moreover, co-infection with *L. infantum* was found in some of these animals. However, in Madrid region, there is no information about the transmission of this trypanosome in rabbits. Hence, in this study we investigate if *T. nabiassi* could be circulating in the aforementioned leishmaniasis focus. Wild *P. perniciosus* female sand flies were captured in the affected area and analyzed using molecular methods. *T. nabiassi* DNA was detected in 20 out of 155 female sand flies fed on rabbits by amplification and subsequent sequencing of ITS1 and SSU rRNA fragments. Therefore, we describe for the first time the presence of *T. nabiassi* and its co-infection with *L. infantum* in *P. perniciosus* female sand flies. More investigation is needed in order to elucidate the role of *P. perniciosus* in the transmission of *T. nabiassi* among rabbits and its potential consequences.

1. Introduction

Phlebotomine sand flies are best known for the transmission of several species of *Leishmania*, but they can also be vectors of other human pathogens such as the bacteria *Bartonella bacilliformis* (Carrion's disease), and several viruses that cause sand fly fever, summer meningitis, vesicular stomatitis and Chandipura virus encephalitis (Depaquit et al., 2010; Maroli et al., 2013). In Spain, there have been described 11 sand fly species, although only *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus ariasi* are proven vectors of leishmaniasis in different regions of the country (Rioux et al., 1986; Gálvez et al., 2010; Suárez-Rodríguez et al., 2012). Recently, *Phlebotomus langeroni* sand flies have been incriminated in *L. infantum* transmission in southeastern Spain (Sáez et al., 2018). Leishmaniasis is hypoendemic in Spain, but since 2010 an unusual increase of both human visceral and cutaneous leishmaniasis cases was observed in southwestern Madrid region (Arce et al., 2013). This is the largest human leishmaniasis outbreak reported in Europe with 733 cases notified until January 2018 (Community of Madrid data). Entomological surveys conducted in the focus have proven that *P. perniciosus* is the only vector involved in the transmission of *Leishmania infantum* in the region. Moreover, the blood meal

identification carried out in engorged *P. perniciosus* females captured in the affected area revealed that most of them fed on rabbits and hares (Jiménez et al., 2013, 2014; González et al., 2017). The role of these lagomorphs in the transmission cycle of *L. infantum* in the area was definitively demonstrated by direct xenodiagnoses assays, which proved their role as reservoirs in the focus (Molina et al., 2012; Jiménez et al., 2014).

Trypanosoma spp. are flagellate protozoa (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) which are worldwide distributed and some species are the causative agents of diseases in humans and other animals (Hoare, 1972; Barrett et al., 2003; Hamill et al., 2013). *Trypanosoma* spp. are transmitted by a variety of hematophagous arthropods, such as tsetse flies, kissing bugs, mosquitoes, and fleas (Desser, 2001; Hamilton et al., 2007). Phlebotomine sand fly are supposed vectors for trypanosomes that affect bats (Zeledón and Rosabal, 1969), lizards (Ayala and McKay, 1971; Gramiccia et al., 1989), snakes (Viola et al., 2008) and toads (Anderson and Ayala, 1968). The presence of trypanosomes such as *Trypanosoma avium*, *Trypanosoma fallisi* or *Trypanosoma mega*, in different sand flies species has been also reported, although most of the studies are from the American continent (Ayala, 1971; Kato et al., 2010, 2011; Rocha et al., 2010; Saraiva et al., 2010; Ferreira et al., 2015) and

* Corresponding authors.

E-mail addresses: rmolina@isciii.es (R. Molina), mjimenez@isciii.es (M. Jiménez).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.011>

Received 8 March 2018; Received in revised form 3 August 2018; Accepted 10 August 2018

Available online 11 August 2018

0001-706X/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.